



Évaluation de ligands pour l'imagerie moléculaire de la néoangiogenèse tumorale

Frédéric Debordeaux

► To cite this version:

Frédéric Debordeaux. Évaluation de ligands pour l'imagerie moléculaire de la néoangiogenèse tumorale. Imagerie. Université de Bordeaux, 2015. Français. NNT : 2015BORD0237 . tel-01290234

HAL Id: tel-01290234

<https://theses.hal.science/tel-01290234>

Submitted on 17 Mar 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOIMAGERIE

Par Frédéric DEBORDEAUX

**ÉVALUATION DE LIGANDS POUR L'IMAGERIE
MOLÉCULAIRE DE LA NÉOANGIOGENÈSE TUMORALE**

Sous la direction de Monsieur le Professeur Philippe FERNANDEZ

Soutenue le 15 décembre 2015

Membres du jury :

Madame le Docteur Sylvie CHALON
Monsieur le Professeur Philippe FERNANDEZ
Monsieur le Professeur Eric FOUQUET
Madame le Docteur Sandrine SILVENTE-POIROT
Monsieur le Professeur Jean-Jacques TOULMÉ
Monsieur le Professeur Jean-Philippe VUILLEZ

Rapporteur
Directeur de Thèse
Examinateur
Examinateur
Président
Rapporteur

Titre : Évaluation de ligands pour l'imagerie moléculaire de la néoangiogenèse tumorale

Résumé :

La néoangiogenèse tumorale est un élément pronostique de l'évolution de nombreux cancers. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ ainsi que la métalloprotéase matricielle 9 (MMP-9), sont des marqueurs de ce processus. Leur ciblage offre la perspective d'une information diagnostique pour la détection précoce, l'évaluation de l'agressivité de pathologies et la sélection de patients répondeurs aux nouvelles thérapies anti-angiogéniques. Dans ce contexte, notre travail s'attèle à mettre au point les techniques nécessaires à la caractérisation de radiotraceurs. Des modèles de tumeurs richement néovascularisées ont été sélectionnés : le mélanome malin et le gliome malin. Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la détection de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Un traceur technétié, le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) a servi de support à la validation de nos techniques d'analyse. Cette méthodologie d'évaluation a ensuite été adaptée à des projets collaboratifs. L'étude du ^{18}F -ribofuranose-RGD est réalisée avec le Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (INSERM UMR 1037) et l'Institut des Sciences Moléculaires (CNRS UMR 5255). Un radioligand de la MMP-9, l' ^{111}In -DOTA-F3B, fait l'objet d'un partenariat avec l'ARNA (ARN : Régulations Naturelle et Artificielle, INSERM UMR 869) et l'Institut Lumière Matière (CNRS UMR 5306). Le composé technétié a démontré une bonne affinité et spécificité pour $\alpha_v\beta_3$. *In vivo*, chez l'animal, les radioligands technétiés et fluorés ont permis l'identification de tumeurs $\alpha_v\beta_3$ positives. L' ^{111}In -DOTA-F3B a, quant à lui, permis la visualisation de tumeurs chez l'animal et sur coupes tissulaires. Ces traceurs constituent une piste intéressante pour l'imagerie de la néoangiogenèse tumorale.

Mots clés : Tomographie par émission de positons, tomographie par émission monophotonique, ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), ^{18}F -ribofuranose-RGD, ^{111}In -DOTA-F3B, néoangiogenèse, intégrine $\alpha_v\beta_3$, métalloprotéase matricielle 9, gliome, mélanome.

Title : Evaluation of tracers for molecular imaging of tumor neoangiogenesis

Abstract :

Tumor neoangiogenesis is a predictive element of the evolution of numerous cancers. $\alpha_v\beta_3$ integrin and matrix metalloprotease 9 (MMP-9) are markers of tumor neoangiogenesis. Their targeting appears of great interest either for early detection, aggressiveness staging of the disease or for selection of responders to new-targeted therapies. In this context, our objective is to develop methodologies needed for radiotracers characterization. Tracers have been investigated in different tumor models for which vascularization is very important: melanoma and glioma. First of all ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) has been assessed in our laboratory and helped us to develop analytical methods. These methodologies were used in different partnership, the evaluation of ^{18}F -ribofuranose-RGD targeting $\alpha_v\beta_3$ with INSERM UMR 1037 and CNRS UMR 5255, and ^{111}In -DOTA-F3B for molecular imaging of MMP-9 with INSERM UMR 869 and CNRS UMR 5306. The technetium peptide has demonstrated good affinity and specificity for $\alpha_v\beta_3$. *In vivo* analysis in mice showed that both tracers were able to identify some $\alpha_v\beta_3$ -positive tumors. ^{111}In -DOTA-F3B allowed us to detect hMMP-9 positive tumors in mice and in tumor tissue sections. In conclusion, these tracers still require to be investigated but represent promising tracers for tumor neoangiogenesis.

Keywords : Positron emission tomography, single photon emission computed tomography, integrin $\alpha_v\beta_3$, ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), ^{18}F -ribofuranose-RGD, ^{111}In -DOTA-F3B, Matrix metalloprotease 9, neoangiogenesis, glioma, melanoma

UNITE DE RECHERCHE

Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine, CNRS UMR 5287,
Université de Bordeaux
Bât. 2A- 2ème étage-Case 22
146 rue Léo Saignat
33076 Bordeaux cedex, France

REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer mes sincères remerciements et ma gratitude

Aux membres du jury qui me font l'honneur de juger ce travail,

Au Professeur Jean-René Cazalets pour m'avoir accueilli au sein de son équipe et pour sa convivialité,

Au Professeur Philippe Fernandez, qui m'a accompagné et conseillé tout au long de mon travail,

À l'ensemble des personnes qui ont collaboré à la réalisation de ce travail au sein de l'Institut de Neurosciences Cognitives et Intégratives d'Aquitaine (CNRS UMR 5287), dans les services de Médecine Nucléaire, de Cytologie et d'Anatomie Pathologique du Centre Hospitalier et Universitaire de Bordeaux, ainsi qu'au sein du laboratoire de chimie de l'ARNA (INSERM U869), du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (INSERM U1037), du laboratoire de Bioingénierie tissulaire (INSERM U1026), de l'INMAS (DRDO, India) et de l'Institut Lumière Matière (CNRS UMR 5306).

À toutes les personnes de l'équipe pour leur aide précieuse et leur accueil : Colette Ries, Jürgen Schulz, Catherine Savona-Baron, Delphine Vimont, et Anil Kumar Mishra,

À toutes les personnes qui ont eu l'occasion de m'entendre râler,

À mes parents, Lucie et l'ensemble de mes proches pour leur soutien.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	18
CONTEXTE SCIENTIFIQUE	22
1. L'angiogenèse	23
1.1. Physiologie de l'angiogenèse	23
1.1.1. <i>La phase d'activation</i>	24
1.1.2. <i>La phase de maturation</i>	26
1.2. Au niveau tumoral	26
1.3. Les facteurs angiogéniques	29
1.3.1. <i>Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)</i>	29
1.3.2. <i>Les intégrines</i>	30
1.3.3. <i>Le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1α)</i>	33
1.3.4. <i>Les autres facteurs de l'angiogenèse</i>	33
1.3.4.1. <i>Le facteur de croissance fibroblastique (FGF)</i>	33
1.3.4.2. <i>Les métalloprotéases matricielles</i>	33
1.3.4.3. <i>Les angiopoïétines</i>	35
1.3.4.4. <i>Les facteurs anti-angiogéniques</i>	35
1.4. Les traitements anti-angiogéniques	35
1.4.1. <i>Les anti-VEGF</i>	37
1.4.1.1. <i>Les anticorps monoclonaux</i>	37
1.4.1.2. <i>Certains inhibiteurs de tyrosine kinase</i>	38
1.4.2. <i>Les antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$</i>	39
1.4.3. <i>Les inhibiteurs de métalloprotéases matricielles</i>	41
1.4.4. <i>Les autres traitements</i>	42
1.5. L'imagerie de l'angiogenèse	43
1.5.1. <i>L'imagerie par résonnance magnétique (IRM)</i>	44
1.5.2. <i>L'imagerie par ultrasons</i>	45
1.5.3. <i>La tomodensitométrie par rayons X (ou scanner, Computed Tomography, CT)</i>	46
1.5.4. <i>L'imagerie optique</i>	46
1.5.5. <i>L'imagerie isotopique</i>	47
1.5.5.1. <i>Bases de médecine nucléaire et de radiopharmacie</i>	47
1.5.5.1.1. Les différentes techniques de détection et d'imagerie isotopique	47
1.5.5.1.1.1. <i>La tomographie par émission monophotonique (TEMP)</i>	47
1.5.5.1.1.2. <i>La tomographie par émission de positons (TEP)</i>	47
1.5.5.1.2. Les différents radionucléides	48
1.5.5.1.2.1. <i>Le rayonnement</i>	48
1.5.5.1.2.2. <i>L'énergie du rayonnement</i>	49

1.5.5.1.2.3. La période physique	49
1.5.5.1.2.4. Autres critères	50
1.5.5.1.3. Le radiomarquage	50
1.5.5.2. L'imagerie isotopique de la néoangiogenèse	52
1.5.5.2.1. Les ligands de VEGF/VEGFR	52
1.5.5.2.2. Les ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	53
1.5.5.2.2.1. Les ligands monomériques.....	53
1.5.5.2.2.2. Amélioration de la biodisponibilité et de la pharmacocinétique.....	55
1.5.5.2.2.2.1. La glycosylation	56
1.5.5.2.2.2.2. La pegylation	56
1.5.5.2.2.2.3. La multimérisation	57
1.5.5.2.2.2.4. Multimérisation : le cas particulier de la bivalence	58
1.5.5.2.2.3. Amélioration de l'étape de radiomarquage	60
1.5.5.2.3. Les ligands de la fibronectine	62
1.5.5.2.4. Les inhibiteurs de métalloprotéases : MMP inhibiteurs	63
2. Les modèles tumoraux étudiés	64
2.1. Le gliome	64
2.1.1. <i>Caractères généraux et épidémiologie</i>	64
2.1.2. <i>Principes généraux du traitement</i>	65
2.2. Le mélanome	66
2.2.1. <i>Caractères généraux et épidémiologie</i>	66
2.2.2. <i>La classification anatomo-clinique</i>	67
2.2.3. <i>Les principes généraux du traitement</i>	67
PARTIE 1 : Mise au point des techniques d'analyse et évaluation du ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK)	70
1. Synthèse et purification du DTPA-bis-c(RGDfK)	72
2. Etude de la fixation du DTPA-bis-c(RGDfK) sur récepteurs (Test de binding)	75
2.1. Matériels et méthodes	75
2.2. Résultats	76
3. Radiomarquage et purification de l'acide diéthylène triamine penta-acétique-bis-c(RGDfK) par le technétium 99 métastable	77
3.1. Matériels et méthodes	77
3.2. Résultats	78
4. Log P du dérivé technétié	81
4.1. Matériels et méthodes	81
4.2. Résultats	81
5. Analyse de la stabilité radiochimique	81

5.1. Matériels et méthodes	81
5.2. Résultats	81
6. <u>Etudes cellulaires</u>	82
6.1. Matériels et méthodes	82
6.1.1. <u>Cultures cellulaires</u>	82
6.1.1.1. Les lignées cellulaires	82
6.1.1.2. Les conditions de cultures	83
6.1.1.3. Congélation/décongélation cellulaire	83
6.1.1.3.1. Congélation des cellules	84
6.1.1.3.2. Décongélation des cellules	84
6.1.2. <u>Analyse immunocytochimique</u>	84
6.1.3. <u>Cytométrie de flux</u>	85
6.1.4. <u>Etude de cytotoxicité</u>	85
6.1.5. <u>Etude de la fixation du radiotracer et de son évolution au cours du temps sur cellules</u>	86
6.1.6. <u>Test de binding du ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) sur cellules</u>	87
6.2. Résultats	87
6.2.1. <u>Etudes cellulaires du DTPA-bis-c(RGDfK)</u>	87
6.2.1.1. Analyse immunocytochimique et cytométrie de flux	87
6.2.1.2. Etude de cytotoxicité	90
6.2.2. <u>Evaluation du radiotracer ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) au niveau cellulaire</u>	91
7. <u>Analyse ex vivo sur coupes tissulaires</u>	92
7.1. Matériels et méthodes	92
7.1.1. <u>Analyse immunohistochimique sur coupes de tumeurs</u>	92
7.1.2. <u>Analyse ex vivo : radiomarquage de coupes tissulaires</u>	93
7.2. Résultats	94
7.2.1. <u>Analyse immunohistochimique sur coupes de tumeurs</u>	94
7.2.2. <u>Analyse ex vivo : radiomarquage de coupes tissulaires</u>	96
8. <u>Evaluation in vivo chez l'animal du peptide radiomarké</u>	99
8.1. Matériels et méthodes	99
8.1.1. <u>Imagerie TEMP-TDM chez la souris xéno greffée</u>	99
8.1.2. <u>Etudes de biodistribution</u>	100
8.2. Résultats	101
8.2.1. <u>Imagerie TEMP-TDM chez la souris xéno greffée</u>	101
8.2.2. <u>Etudes de biodistribution</u>	103
<u>Article 1</u>	106

PARTIE 2 : Transposition de nos techniques d'analyse pour l'évaluation du ^{18}F-ribofuranose-RGD et de ^{111}In-DOTA-F3B.....	117
1. Le ^{18}F-ribofuranose-RGD.....	118
1.1.Synthèse, marquage et purification du dérivé fluoré.....	118
1.1.1. <i>Matériels et méthodes</i>	118
1.1.1.1.Synthèse du peptide ribofuranose-RGD.....	118
1.1.1.2.Radiomarquage du ribofuranose-c(RGDfK) par le fluor 18	120
1.1.1.3.Purification et contrôle du radiotraceur.....	122
1.1.2. <i>Résultats</i>	123
1.2.Exploration <i>in vivo</i> chez le petit animal.....	125
1.2.1. <i>Matériels et méthodes</i>	125
1.2.1.1.Analyse préclinique chez la souris du dérivé fluoré	125
1.2.1.1.1. Imagerie TEP/TDM chez la souris C57Black/6.....	125
1.2.1.1.2. Etude de la biodistribution du ^{18}F -ribofuranose chez l'animal.....	126
1.2.2. <i>Résultats</i>	126
1.2.2.1.Imagerie TEP/TDM chez la souris C57Black/6.....	126
1.2.2.2.Etude de la biodistribution du ^{18}F -ribofuranose chez l'animal.....	127
2. L'^{111}In-DOTA-F3B.....	130
2.1.Synthèse et radiomarquage du traceur	130
2.1.1. <i>Matériels et méthodes</i>	130
2.1.1.1.Synthèse du F3B-DOTA	131
2.1.1.2.Radiomarquage de l'aptamère à l'indium 111	132
2.1.2. <i>Résultats</i>	133
2.2.Etudes <i>ex vivo</i> sur coupes tumorales.....	133
2.2.1. <i>Matériels et méthodes</i>	133
2.2.1.1.Analyse immunohistochimique sur coupes de tumeurs.....	133
2.2.1.2.Radiomarquage sur coupes.....	134
2.2.2. <i>Résultats</i>	134
2.2.2.1.Analyse immunohistochimique sur coupes de tumeurs.....	134
2.2.2.2.Radiomarquage sur coupes.....	139
<u>Article 2</u>	141
DISCUSSION ET PERPECTIVES	175
CONCLUSION GENERALE	185
BIBLIOGRAPHIE	187
ANNEXES	205
PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES.....	213

LISTE DES ABREVIATIONS

AEC : 3-Amino-9-ethylcarbazole
ALM : Acral Lentiginous Melanoma (Mélanome des extrémités)
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
Ang-1 : Angiopoïétine 1
ATP : Adénosine Tri Phosphate
ATU : Autorisation Temporaire d'Utilisation
bcl 2 : B-cell lymphoma 2
BCNU : Carmustine ou BIs-ChloroethylNitrosoUrea
bFGF : basic Fibroblast Growth Factor
Bq : Becquerel
BSA : Bovine Serum Albumin (Sérum albumine bovine)
CB-TE2A : 4,11-bis(carboxymethyl)-1,4,8,11-tetraazabicyclo[6.6.2]hexadecane
CCNU : Lomustine ou 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-nitrosourea
CEUS : Contrast Enhanced Ultra Sonography
Ci : Curie
CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance
c-MET : c-Mesenchymal Epithelial Transition
c(RGDfK) : cyclo (-Arg-Gly-Asp-DPhe-Lys-)
c(RGDyK) : cyclo (-Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys-)
III CS : III Connecting Segment
CT : Computed Tomography
CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated protein 4
DAB : 3,3'-DiAminoBenzidine
DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMF : DiMethylFormamide
DMLA : Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age
DMSO : DiMethyl SulfOxyde
DOTA : Acide tétra-aza-1,4,7,10-cycloDodécane-N,N',N'',N'''-Tétra-Acétique
DTPA : Acide Diéthylène-Triamine-Penta-Acétique
ED : Extra Domain
EDTA : Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique

EGF : Epidermal Growth Factor

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EPPI : Eau Pour Préparation Injectable

FBEM : FluoroBenzamido-Ethyl-Maleimide

FBOA : N-(4-[¹⁸F]FluoroBenzylidene)-Oxime

FDA : Food and Drug Administration

FDG : Fluoro-Desoxy-Glucose

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

FLT1: Fms-Like Tyrosine kinase 1

FMAME : ester méthylique de l'acide (2R)-2-[[4-(6-fluorohex-1-ynyl)phenyl]sulfonylamino]-3-methylbutyrique

FMISO : FluoroMISONidazole

FU : Fixation Unit (Fixation cellulaire)

G3 : Triglycine

GDNF : Glial cell line Derived Neurotrophic Factor

GFP : Green Fluorescent Protein

GIST : Gastro-Intestinal Stromal Tumor

GM-CSF : Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor

HIF : Hypoxia Inducible Factor

HLB : Hydrophylic Lipophylic Balanced

HYNIC : Acide hydrazino-nicotinique

IC₅₀ : Concentration Inhibitrice 50

IGF-1 : Insulin-like Growth Factor-1

IL : InterLeukine

IFN α et β : Interférons α et β

IR : Infra-Rouge

IRM : Imagerie par Résonnance Magnétique

IRS : Immuno Reactive Score

KDR : Kinase insert Domain Receptor

KIT : du nom d'un oncogène viral

Lck : Lymphocyte-specific tyrosine-protein kinase

LMM : Lentigo Maligna Melanoma (Mélanome lentigo ou mélanome de Dubreuilh)

Lyn : Tyrosine-protein kinase lyn

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation – Time Of flight
 MAP : Mitogen Activated Protein
 MET : Mesenchymal Epithelial Transition
 MMP : Matrix Metalloprotease
 MN : Nodular Melanoma (Mélanome nodulaire)
 MSMA : Acide Methoxybiphenyl-4-Sulfonylamino)-3-Methylbutyrique
 mTOR : mammalian Target Of Rapamycin
 NODAGA : Acide-1,4,7-triazacyclononane-1-glutarique acide-4,7-diacétique
 NOPO : Acide-1,4,7-triazacyclononane-1,4-bis[acide
 methylene(hydroxymethyl)phosphinique]-7-[methylene(2-carboxyethyl)phosphinique
 NOTA : Acide-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique
 NSB : Non Specific Binding (Liaison non spécifique)
 OMS : Organisation Mondiale de la Santé
 PB : Proteolytic Beacon
 PEG : PolyEthylène Glycol
 PBS : Phosphate buffer saline (Tampon phosphate salin)
 PD-1 : Programmed Death-1
 PDGF : Platelet Derived Growth Factor
 PDGFR α et β : Platelet Derived Growth Factor Receptor α et β
 PlGF : Placenta Growth Factor
 PRC : Pureté RadioChimique
 QD : Quantum Dots
 RAFT : Regioselectivity Addressable Functionalized Template
 RET : REarranged during Transfection
 RGD : Séquence Arginine-Glycine-Acide Aspartique
 RMN : Résonance Magnétique Nucléaire
 ROI : Regions Of Interests
 Rpm : Rotation par minute
 RPMI : Roswell Park Memorial Institute
 SCF : Stem Cell Factor
 SCN-Bz-NOTA : Acide isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique
 SDF1 : Stroma cell Derived Factor 1
 SELEX : Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment
 SPIO : Super Paramagnetic Iron Oxide

Src : Sarcoma, proto-oncogène tyrosine-protein kinase src
SSM : Superficial Spreading Melanoma (Mélanome à extension superficielle)
SVF : Sérum de Veau Foetal
 ^{99m}Tc : Technétium 99 métastable
TDM : TomoDensitoMétrie
TEL : Transfert d'Energie Linéique
TEMP : Tomographie par Emission MonoPhotonique
TEP : Tomographie par Emission de Positons
TGF- β : Transforming Growth Factor- β
TIE : Tunical Internal Endothelial
TIMP : Tissue inhibitors of metalloproteases
TNF : Tumor Necrosis Factor
TNM : Tumor, Nodes, Metastasis (Tumeur primitive, ganglions lymphatiques voisins, métastases)
TP53 : Tumor Protein 53
TRAP : TRiAzacyclononane-Phosphinate
UV : UltraViolet
VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
VHL : Von Hippel-Lindau

LISTE DES FIGURES

<i>Figure 1</i> : Les principales étapes de l'angiogenèse.....	24
<i>Figure 2</i> : Schéma des différentes sous-unités α et β des intégrines.....	30
<i>Figure 3</i> : Les différents niveaux d'inhibition de l'angiogenèse tumorale	36
<i>Figure 4</i> : Schéma des principales structures cyclique RGD utilisées pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$	53
<i>Figure 5</i> : Principaux exemples de structures carbohydrate conjuguées aux peptides RGD cycliques.....	53
<i>Figure 6</i> : Schéma représentant la structure HYNIC conjuguée au peptide cyclique c(RGDfK)	54
<i>Figure 7</i> : Schéma des structures couplant acides aminés hydrophiles et séquence RGD	55
<i>Figure 8</i> : Schéma des structures dimériques HYNIC et DOTA conjuguées aux peptides RGDfK	57
<i>Figure 9</i> : Schéma des dimères DOTA-3G ₃ et DOTA-3PEG ₄	59
<i>Figure 10</i> : Schéma du dimère contenant la structure N-(4- ¹⁸ F-fluorobenzylidene)oxime (FBOA).....	60
<i>Figure 11</i> : Schéma de synthèse du précurseur DTPA-bis-c(RGDfK)	71
<i>Figure 12</i> : Spectrométrie de masse en MALDI-TOF du DTPA-bis-c(RGDfK)	73
<i>Figure 13</i> : Profil CLHP du DTPA-bis-c(R(Pbf)GD(tBu)fK)	74
<i>Figure 14</i> : Profil CLHP du DTPA-bis-c(RGDfK).....	75
<i>Figure 15</i> : Détermination de l'affinité du traceur technétié (Etude de déplacement).....	76
<i>Figure 16</i> : Schéma du ^{99m} Tc-DTPA-bis-c(RGDfK)	78
<i>Figure 17</i> : Contrôle CLHP de la pureté radiochimique du radiotraceur.....	79
<i>Figure 18</i> : Evaluation de la pureté radiochimique du traceur par chromatographie couche mince	80
<i>Figure 19</i> : Immunofluorescence des différentes lignées cellulaires	88
<i>Figure 20</i> : Validation par cytométrie de flux de nos lignées cellulaires quant à l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: exemple des cellules U87MG	89
<i>Figure 21</i> : Etude de la toxicité du traceur sur cellules U87MG	90
<i>Figure 22</i> : Etude de la toxicité du traceur sur cellules HEK293	91
<i>Figure 23</i> : Cinétique de fixation du ^{99m} Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) chez les cellules B16F10 .	91
<i>Figure 24</i> : Détermination de l'affinité du traceur technétié (test de binding)	92

<i>Figure 25</i> : Immunohistochimie sur coupes tissulaires de mélanomes et de métastases pulmonaires	95
<i>Figure 26</i> : Immunohistochimie sur coupes de gliomes à l'aide de l'anticorps LM609 anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ humaine.....	96
<i>Figure 27</i> : Comparaison des résultats obtenus par radiomarquage au ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) et par immunohistochimie (mélanomes)	96
<i>Figure 28</i> : Comparaison des résultats obtenus par radiomarquage au ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) et par immunohistochimie (gliomes)	97
<i>Figure 29</i> : Radiomarquage sur coupes tissulaires de mélanomes	97
<i>Figure 30</i> : Etude de déplacement du traceur technétié par un excès de ligand froid sur coupes tissulaires de mélanomes	98
<i>Figure 31</i> : Administration du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) chez la souris nude xéno greffée	102
<i>Figure 32</i> : Image de souris nude athymique xéno greffée de tumeur U87MG après injection de 24,2 MBq de traceur et 1 heure de compétition à l'aide d'un excès de c(RGDfK)	103
<i>Figure 33</i> : Etude de biodistribution du radiotraceur chez la souris nude xéno greffée de tumeur U87MG	104
<i>Figure 34</i> : Biodistribution du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) seul et en présence d'un excès de compétiteur froid, c(RGDfK)	105
<i>Figure 35</i> : Principe du marquage par échange isotopique	119
<i>Figure 36</i> : Schéma présentant : (A) la régiosélectivité de la réaction de « chimie click » et, (B) le mécanisme de la CuAAC.	119
<i>Figure 37</i> : Structure du ^{18}F - ribofuranose-c(RGDfK)	120
<i>Figure 38</i> : Représentation de l'interface informatique écrite grâce au programme « synthetiser FxF-N tracerLab ». La séquence est constituée d'une succession d'évènements programmés dans le temps (ouverture et fermeture des vannes, chauffage ou refroidissement du réacteur...).	121
<i>Figure 39</i> : ^{18}F -ribofuranose-RGD	123
<i>Figure 40</i> : Chromatographie réalisée dans le cadre du contrôle de la pureté radiochimique du ^{18}F -ribofuranose-RGD	124
<i>Figure 41</i> : Coupes axiales et transversales de souris C57black/6 porteuses de mélanomes murins B16F10.....	127
<i>Figure 42</i> : Histogramme représentant les résultats de l'analyse de la biodistribution du ^{18}F -ribofuranose-RGD chez des souris black porteuses de tumeurs mélaniques B16F10	128

<i>Figure 43</i> : Ratios de fixation tumeur/muscle obtenus chez des souris C57Black/6 greffées de tumeurs B16F10	128
<i>Figure 44</i> : Biodistribution comparative du ¹⁸ F-ribofuranose-RGD chez des souris black porteuses de tumeurs mélaniques B16F10, traitées ou non par un médicament expérimental anti-angiogénique	129
<i>Figure 45</i> : Ratios de fixation tumeur/muscles obtenus chez des souris C57Black/6 greffées de tumeurs B16F10 traitées ou non.....	130
<i>Figure 46</i> : Méthode de sélection et d'élaboration de l'aptamère F3B.....	131
<i>Figure 47</i> : Couplage du F3B-Spacer-NH ₂ avec le chélateur DOTA).....	132
<i>Figure 48</i> : Détection de la MMP-9 sur coupes de mélanome A375.....	135
<i>Figure 49</i> : Immunohistochimie d'un ganglion essentiellement métastatique.....	136
<i>Figure 50</i> : Mélanome SSM.....	137
<i>Figure 51</i> : Mélanome de Dubreuilh.....	138
<i>Figure 52</i> : Mélanome nodulaire.....	138
<i>Figure 53</i> : Comparaison des résultats obtenus entre l'immunohistochimie (anticorps ab58803 anti-MMP-9) et les radiomarquages à l' ¹¹¹ In-DOTA-F3B et ¹¹¹ In-DOTA-Ctl sur coupes de mélanomes.....	139

LISTE DES TABLEAUX

<i>Tableau 1</i> : Présentation du rôle des intégrines.....	31
<i>Tableau 2</i> : Inhibiteurs de tyrosine kinases commercialisés (Vidal, thériaque)	39
<i>Tableau 3</i> : Description et résultats IRS des différents types de mélanomes étudiés	135
<i>Tableau 4</i> : Immunoréactivité et classification IRS (Immuno Reactive Score).....	136

INTRODUCTION

L'essor des thérapies ciblées en oncologie conduit à envisager une prise en charge médicale personnalisée des patients. En effet, une meilleure compréhension des processus tumoraux a permis d'identifier de nouvelles cibles moléculaires à l'origine de nouvelles thérapies. La substitution ou l'association de ces thérapies ciblées aux traitements classiques nécessite le développement de techniques d'imagerie spécifiques afin de sélectionner les patients potentiellement répondeurs, de déterminer la dose optimale à administrer ou d'assurer leur suivi thérapeutique. Cette démarche pourra conduire à une prise en charge thérapeutique plus adaptée et à une meilleure gestion du coût des pathologies cancéreuses [1]. L'imagerie moléculaire s'avère l'examen complémentaire de choix pour satisfaire à ces objectifs. Parmi les processus à étudier, la néoangiogenèse tumorale est un des éléments pronostiques de l'évolution de nombreux cancers. Son imagerie est aussi susceptible de diagnostiquer la maladie à un stade précoce. En outre, agir en prévention de la formation de néovaisseaux pourrait réduire la croissance tumorale et limiter son potentiel métastatique [2].

Les cellules endothéliales des néovaisseaux tumoraux, mais aussi des cellules tumorales surexpriment des marqueurs spécifiques de la néoangiogenèse tumorale tels qu'une molécule d'adhésion, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, qui reconnaît les peptides possédant le motif RGD (-Arg-Gly-Asp-). Cette molécule une fois activée par des ligands endogènes entraîne la migration de la cellule endothéliale, inhibe son apoptose et favorise les interactions entre cellules et matrice extracellulaire [3]. L'inhibition de cette intégrine *via* l'action d'antagonistes de la séquence RGD constitue une nouvelle stratégie thérapeutique des pathologies cancéreuses [4]. Différents traceurs ont ainsi vu le jour, tels que le ^{18}F -Galacto-RGD pour la tomographie par émission de positons (TEP) et le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -HYNIC-RGD pour la tomographie par émission monophotonique (TEMP) [5].

D'autres mécanismes impliqués dans l'envahissement tissulaire ont été explorés. La surexpression des métalloprotéases de la matrice extracellulaire (MMP) engendre la dégradation des composants de cette matrice et favorise la migration cellulaire. Deux enzymes sont plus particulièrement impliquées lors de la dégradation de la matrice facilitant la néoangiogenèse et la formation de métastases, il s'agit des MMP-2 et MMP-9, aussi appelées gélatinases. Ces MMP constituent une alternative thérapeutique intéressante, et leur ciblage pourrait renseigner quant à l'envahissement tumoral [6–9].

Certains modèles de tumeurs sont richement « néovascularisés », c'est notamment le cas du mélanome malin et du gliome malin. Malgré l'évolution de l'arsenal thérapeutique

(chirurgie, chimiothérapie, radiothérapie), ces pathologies demeurent bien souvent fatales. La néoangiogenèse y joue un rôle fondamental, tant dans la croissance tumorale, que dans le processus métastatique. Les gliomes malins font partie des tumeurs les plus vascularisées. La densité microvasculaire est un facteur pronostique important pour ces pathologies. Quant au mélanome malin, une détection précoce est cruciale pour la prise en charge thérapeutique. De plus, les techniques d'imageries conventionnelles peinent à fournir des informations précises sur l'efficacité des thérapeutiques. De fait de nouveaux outils sont nécessaires. L'imagerie moléculaire proposée par la médecine nucléaire a donc pour but de caractériser les tumeurs solides afin d'obtenir les informations nécessaires à la prise en charge adéquate des patients.

Dans ce contexte, l'objectif de notre thèse est de mettre au point l'ensemble des techniques nécessaires au développement et la validation de radiotraceurs.

Pour des raisons de radioprotection et de disponibilité en radionucléide, nous nous sommes initialement intéressés à un traceur technétié. Le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) a donc été élaboré au sein de notre laboratoire pour le développement des procédés d'analyse et pour l'imagerie moléculaire de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

Notre méthodologie d'évaluation a ensuite été transposée pour la caractérisation de nouveaux traceurs de la néoangiogenèse tumorale dans le cadre de projets de recherche collaboratifs. Le ribofuranose-RGD a été synthétisé au sein de l'équipe du Professeur Eric Fouquet (Institut des Sciences Moléculaires, CNRS UMR 5255). Suite à son radiomarquage avec le fluor 18 au sein de notre laboratoire, l'étude de ce traceur chez le petit animal lors d'imagerie non invasive corps entier, a été pratiquée en collaboration avec le Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (INSERM UMR 1037). Dans un second temps, un nouveau traceur de la MMP-9, l' ^{111}In -DOTA-F3B, a été élaboré à base d'aptamères par l'équipe du Professeur Jean-Jacques Toulmé (l'ARNA (ARN : Régulations Naturelle et Artificielle), INSERM UMR 869) et radiomarké en partenariat avec l'équipe du Professeur Marc Janier (Institut Lumière Matière, CNRS UMR 5306).

Ainsi, notre travail de thèse s'est articulé autour de trois traceurs, deux ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, un pour l'imagerie de la MMP-9, et ce dans deux domaines de l'oncologie que sont le gliome et le mélanome malin.

Ce projet s'est tout d'abord focalisé sur le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) pour son étude et la validation des techniques :

- La mise au point et l'optimisation du radiomarquage de la purification et du contrôle de peptides d'intérêt.
- La validation de modèles cellulaires et tissulaires exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ respectivement par immunocytochimie et immunohistochimie.
- La détermination des propriétés pharmacocinétiques de traceurs et la validation *ex vivo* de traceurs pour la visualisation des récepteurs $\alpha_v\beta_3$ sur coupes de tissus humains et cultures cellulaires.
- La validation préclinique chez le petit animal
 - Imagerie TEMP
 - Biodistribution

Certaines de ces méthodes d'analyse ont ensuite été adaptées pour l'étude du ^{18}F -ribofuranose-RGD et enfin de l' ^{111}In -DOTA-F3B.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Dans un premier temps, nous développerons les mécanismes de néoangiogenèse impliqués dans le processus oncologique et les modalités d'imagerie disponibles, en nous attardant sur les deux cibles concernées par notre travail, principalement l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et également la MMP-9. Puis les modèles tumoraux étudiés seront discutés.

1. L'angiogenèse

1.1. Physiologie de l'angiogenèse

L'angiogenèse ou néovascularisation correspond à la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir d'un réseau préexistant. Ce phénomène est susceptible de se produire lors d'évènements variés de la vie comme lors de l'embryogenèse, du cycle menstruel féminin, ou lors de la cicatrisation des tissus [10]. L'angiogenèse peut également jouer un rôle lors de différents processus pathologiques, tels que la rétinopathie diabétique, l'inflammation chronique, le développement tumoral et la formation de métastases. Les mécanismes de l'angiogenèse sont divers. L'angiogenèse peut être issue d'un bourgeonnement. Celui-ci est initié par un gradient de facteurs angiogènes diffusibles, tels que le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), sécrété en abondance par les cellules tumorales. Lors de ce processus, on distingue deux étapes, tout d'abord une phase d'activation, suivie par une phase de maturation [3,11].

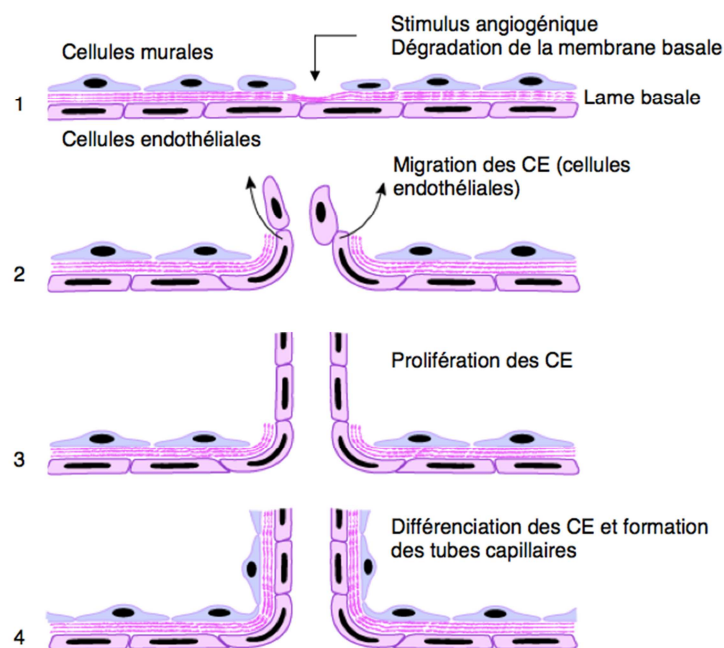


Figure 1 : Les principales étapes de l'angiogénèse

d'après Sancey, L. Evaluation d'un radioligand de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (RAFT-RGD) pour l'imagerie moléculaire de l'angiogénèse tumorale. Doctorat Génie Biologique et Médical. Université Joseph Fourier Grenoble ; 1 juin 2006.

1.1.1. La phase d'activation

Le vaisseau sanguin est constitué de cellules endothéliales quiescentes qui forment une monocouche délimitant la lumière où circule le sang. Ces cellules sont recouvertes d'une membrane basale et entourées d'une matrice extracellulaire contenant notamment les cellules musculaires lisses.

L'hypoxie est à l'origine d'une activation des cellules endothéliales qui sécrètent alors du VEGF et de l'angiopoïétine 2 (**Figure 1**). Cette initiation de la réponse angiogénique, sous l'effet des facteurs sécrétés, se caractérise par une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'affaiblissement des jonctions intercellulaires. Un stimulus angiogénique, sous la forme d'un gradient de VEGF génère une réponse hiérarchisée au sein de laquelle les cellules endothéliales se mettent en mouvement progressivement vers la source de facteur angiogène. Dans un premier temps, il se produit un détachement des cellules endothéliales vis-à-vis des péricytes, ainsi que la sélection d'une cellule pionnière (tip-cell). Cette cellule oriente la migration au sein de la matrice extracellulaire vers la source de VEGF, tout en émettant des

filopodes. Un second type cellulaire intervient au sein du bourgeon endothélial, il s'agit de cellules tiges (stalk cell). Ces cellules se divisent, sans émission de filopodes, sous l'effet du VEGF, et permettent l'allongement progressif du bourgeon [12,13].

En parallèle, les métalloprotéases assurent la destruction locale de la lamina et de la matrice extracellulaire afin de dégager l'espace nécessaire à la migration cellulaire, et de libérer les facteurs de croissance stockés dans la matrice (VEGF, Fibroblast Growth Factor FGF...).

D'autre part, les cellules impliquées expriment de multiples protéines d'adhésion, le facteur von Willebrand, la fibrine, la fibronectine et les intégrines dont l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Suite à l'activation des cellules endothéliales, le vaisseau initial subit divers changements morphologiques. Ce vaisseau s'élargit afin de pouvoir donner naissance à des capillaires et veinules. Il développe une double paroi épaisse de cellules endothéliales avec une diminution du nombre et un détachement des péricytes, et une dégradation de la membrane basale. Ceci conduit à l'obtention d'une structure hyperperméable, avec un nombre important de fenestrations.

Cette première phase aboutit donc à une dilatation microvasculaire, une hyperperméabilité, des dépôts de fibrine extravasculaires et des oedèmes.

Le système Notch/DII4 contrôle la spécification cellulaire et régule la ramification vasculaire. La cellule pionnière, stimulée par le VEGF, surexprime DII4. Ce dernier se lie aux récepteurs Notch de la cellule tige et réprime alors l'expression de VEGFR-2 à sa surface. En conséquence, la réponse migratoire diminue, et la cellule tige s'engage dans une réponse mitogène [13].

Lorsque deux cellules pionnières se rencontrent, elles établissent une jonction qui conduit à la création d'une nouvelle anastomose microvasculaire. La formation d'une lumière vasculaire fait appel à la fusion de vacuoles intracellulaires, puis intercellulaires, et requiert l'intervention de glycoprotéines telles que la galectine-2 et la VE-cadhérine [12].

De nombreux facteurs sont produits par les cellules endothéliales en multiplication : IGF-1 (Insulin-like Growth Factor-1), bFGF (basic Fibroblast Growth Factor), des cytokines telles que les interleukines IL-1, IL-6, IL-8 et le GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor).

1.1.2. La phase de maturation

Dans un second temps, le néovaisseau est stabilisé par l'élaboration d'une membrane basale, et d'une couverture péricytaire et musculaire. Pour cela, les cellules endothéliales sécrètent des facteurs de maturation (PDGF- β (Platelet Derived Growth Factor), TGF- β (Transforming Growth Factor β), angiopoïétine). Ces facteurs assurent le recrutement des progéniteurs mésenchymateux, ils induisent leur différenciation en péricytes, et stimulent la synthèse d'une matrice extracellulaire autour du vaisseau nouvellement formé.

Les péricytes au contact direct des cellules endothéliales, ainsi que les cellules musculaires lisses au contact de la membrane des vaisseaux sont appelés cellules murales.

La différenciation artério-veineuse nécessite l'intervention de ligands transmembranaires Ephrin-B2 (orientant vers la différenciation artérielle) et Ephrin-B4 (orientant vers la différenciation veineuse) [14].

D'autres interactions jouent un rôle fondamental au cours de ce processus, c'est notamment le cas de l'interaction Ang-1/TIE-2, qui permet la formation de tubules vasculaires, la survie des cellules endothéliales, et la sécrétion de PDGF et d'autres chémokines impliquées dans le recrutement de cellules musculaires lisses et de péricytes. L'interaction entre ces différents composants des vaisseaux conduit à la sécrétion de TGF- β , un inhibiteur endogène de l'angiogenèse, et donc clôt ce processus.

Une fois stabilisé, le néovaisseau entre en quiescence et, chez l'adulte, reste remarquablement stable. La cellule endothéliale quiescente ne se renouvelle que tous les 2 ou 3 ans.

1.2. Au niveau tumoral

La transformation du processus normal en une forme cancéreuse repose sur un minimum de six altérations : immortalité cellulaire par inhibition de l'apoptose, indépendance vis-à-vis de l'ancrage, de même que vis-à-vis des signaux de prolifération, perte de l'inhibition de contact, acquisition d'un pouvoir invasif, et capacité à induire l'angiogenèse.

Concernant l'évolution tumorale, deux périodes sont à distinguer. D'une part, lorsque la tumeur est de très petite taille, celle-ci demeure quiescente ou croît lentement grâce à la

diffusion passive d'oxygène et de nutriments. Cette première phase de développement limité peut durer quelques mois à plusieurs années. La tumeur peut alors infiltrer les vaisseaux existants pour élaborer une mosaïque vasculaire faite d'un « mélange » de cellules endothéliales et de cellules tumorales infiltrées, on parle de « cooption de vaisseaux ». Ce phénomène permet d'alimenter la périphérie tumorale. Les cellules cancéreuses utilisent leur capacité à dégrader et remodeler localement la matrice extracellulaire. Ceci leur permet de proliférer de manière anarchique et de profiter des vaisseaux sanguins les plus proches. Lorsque la masse tumorale atteint quelques millimètres cube (1 à 3 mm³), les phénomènes de diffusion passive ne sont plus suffisants pour alimenter la tumeur en oxygène et en nutriments, ainsi que pour l'élimination des déchets. Pour que la croissance tumorale puisse se poursuivre, il est alors nécessaire qu'un réseau sanguin se développe autour d'elle. Donc, à partir de cette taille, le centre de la tumeur devient hypoxique et commence à produire des facteurs comme le facteur inductible par l'hypoxie (HIF). Ce facteur est étroitement lié à la pression partielle intracellulaire en oxygène, et conduit à l'expression de nombreux gènes dont celui du VEGF. Ce phénomène est au cœur de l'émergence d'une néovascularisation nécessaire à la croissance tumorale, c'est le switch angiogénique [15]. Cette étape est indispensable à la transformation d'une tumeur quiescente en une forme agressive, et s'accompagne d'un déséquilibre entre les processus d'activation et d'inhibition de l'angiogenèse [16]. De nombreux facteurs pro-angiogéniques sont alors sécrétés (VEGF, PDGF, FGF, TGF- β , TNF- α , Tumor Necrosis Factor alpha) et des facteurs anti-angiogéniques circulants sont inhibés (thrombospondine...).

Un nouveau réseau vasculaire se met en place et contrôle l'apport en oxygène et en nutriments essentiels à la survie et à la prolifération cellulaires, ainsi qu'à l'élimination des déchets toxiques. Il augmente aussi la fuite des cellules tumorales vers le système lymphatique et vers la circulation sanguine, favorisant la survenue de métastases mais aussi l'envahissement de la tumeur par des leucocytes. Les cellules de l'immunité favorisent le processus inflammatoire et la croissance tumorale. En effet, en plus de l'hypoxie, l'inflammation mais aussi l'acidose peuvent amplifier la néoangiogenèse tumorale, la survie et la croissance des cellules tumorales, ainsi que leur migration hors de la tumeur.

Au final, l'angiogenèse tumorale aboutit à un réseau fonctionnellement et structurellement anormal en remodelage constant, alternant des phases de croissance et de régression. Ce réseau est désorganisé, anarchique et instable. Le recrutement des péricytes y est incomplet, et la perméabilité capillaire accrue. Ceci conduit à la formation de lacs

vasculaires, d'hémorragies et au passage de liquide plasmatique vers le secteur interstitiel. Des shunts artério-veineux sont susceptibles de s'établir, ce qui concourt à l'obtention d'un flux sanguin irrégulier, non contrôlé par les agents vaso-actifs. Le diamètre des vaisseaux est inégal et irrégulier en fonction de la compression de la paroi immature par les cellules tumorales adjacentes. Au sein de la tumeur, les cellules endothéliales sont également hétérogènes, certaines sont immatures, actives et en prolifération, alors que d'autres sont quiescentes voire même entrent en apoptose.

Ces structures anormales génèrent également des anomalies fonctionnelles. En effet, une hétérogénéité des flux sanguin et lymphatique est à l'origine d'une distribution variable des nutriments et des drogues, limitant par ailleurs l'action des cytotoxiques [17,18].

Le micro-environnement tumoral n'échappe pas à ces perturbations. La fibrose interstitielle et la contraction de la matrice extracellulaire interstitielle intratumorale, de même que la vascularisation chaotique et la perméabilité accrue favorisent une élévation de la pression interstitielle, une diminution de la pression artérielle en oxygène et une acidose.

D'autres mécanismes sont mis en jeu et concourent à la vascularisation des tumeurs. La tumeur peut, en effet, coopter les vaisseaux irriguant le tissu sain avoisinant. La néoangiogenèse peut aussi impliquer la participation de cellules souches médullaires. Des précurseurs circulants, tels que des cellules endothéliales, sont recrutés et peuvent participer à l'élaboration de nouveaux vaisseaux. La formation de ces vaisseaux peut être la résultante d'une scission de vaisseaux existants, on parle alors d'une intussusception. Il peut aussi s'agir d'une prolifération de cellules endothéliales au sein de la lumière vasculaire aboutissant à la création de canaux distincts, c'est la septation.

Le réseau lymphatique mis en place autour de la tumeur draine le liquide interstitiel intratumoral, mais est également susceptible de véhiculer les cellules cancéreuses et favoriser leurs disséminations métastatiques.

Enfin, des pseudo-vaisseaux peuvent se former dans la tumeur par « mimétisme vasculaire ». La bordure vasculaire est alors constituée, non pas de cellules endothéliales, mais de cellules tumorales [19].

Le pronostic d'un cancer est dépendant de la taille de la tumeur et de l'envahissement des organes voisins (T), de l'atteinte ganglionnaire médiastinale (N), et de la présence de métastases (M). Ces paramètres définissent le stade du cancer (classification TNM). La

présence d'une atteinte ganglionnaire et de métastases est un facteur de mauvais pronostic, or l'angiogenèse les favorise.

De nombreux états pathologiques sont caractérisés par une stimulation de l'angiogenèse. C'est notamment le cas du psoriasis, de la resténose (après angioplastie et pose de stent, rôle notamment de la néoangiogenèse et des macrophages de la paroi vasculaire dans le processus inflammatoire favorisant la resténose), de l'arthrite rhumatoïde, de la rétinopathie diabétique, et de la croissance tumorale [20].

1.3. Les facteurs angiogéniques

L'angiogenèse met en jeu tout un éventail de facteurs, régulateurs positifs (VEGF, intégrines, etc...) ou négatifs (angiostatine, endostatine, thrombospondine, etc...). Tous sont des cibles thérapeutiques faisant actuellement l'objet de développements pharmacologiques.

1.3.1. Le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

Le VEGF est une glycoprotéine de 45 kDa codée par un gène localisé sur le chromosome 6 (6p21). Il appartient à une famille de cinq protéines homologues : VEGF (VEGF-A), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF (Placenta Growth Factor). Certains agissent préférentiellement sur l'endothélium sanguin, c'est le cas de VEGF-A, VEGF-B, et PlGF, alors que VEGF-C et VEGF-D présentent une spécificité d'action pour l'endothélium lymphatique [21].

Le VEGF (VEGF-A) est un dimère constitué de 2 glycoprotéines présentant 7 isoformes homodimériques. Parmi celles-ci, VEGF₁₂₁ est soluble, VEGF₁₆₅ est sécrété alors que VEGF₁₈₉ et VEGF₂₀₆ restent localisés dans la matrice extracellulaire.

L'expression de VEGF dans la tumeur peut être stimulée par des facteurs génétiques, tels que l'activation d'oncogènes (sarcoma, *SRC*) ou l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur (Tumor Protein 53, *TP53* et von Hippel-Lindau, *VHL*). Toutefois, la synthèse de ce facteur repose surtout sur des facteurs environnementaux : un pH bas, des cytokines inflammatoires (IL-6), des facteurs de croissance (bFGF), des hormones sexuelles (androgènes et estrogènes), et des chémokines (Stroma cell Derived Factor 1, SDF1).

L'hypoxie demeure le principal élément déclenchant la production de VEGF par les cellules tumorales [22].

Le VEGF intervient de manière directe et dose-dépendante sur l'angiogenèse. Il se lie avec les récepteurs à activité tyrosine-kinase VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptors, encodés par le gène Fms-Like Tyrosine kinase, *FLT1*, Kinase insert Domain Receptor *KDR* et *FLT4* respectivement). Cette interaction induit la différenciation et la prolifération des cellules endothéliales, ainsi que leur migration lors de l'élaboration des néovaisseaux.

Le VEGF augmente la perméabilité vasculaire. Il conduit à la production de monoxyde d'azote, et à l'expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules (intégrines). Il induit l'activation de deux systèmes de protéases : le système activateur du plasminogène et celui des métalloprotéases de la matrice. Le VEGF peut aussi inhiber les cellules dendritiques présentatrices de l'antigène, en mobilisant les macrophages et les cellules progénitrices des cellules endothéliales. L'ensemble de ces actions favorise la néoangiogenèse et la formation d'un micro-environnement favorable à la croissance des cellules tumorales [23].

1.3.2. Les intégrines

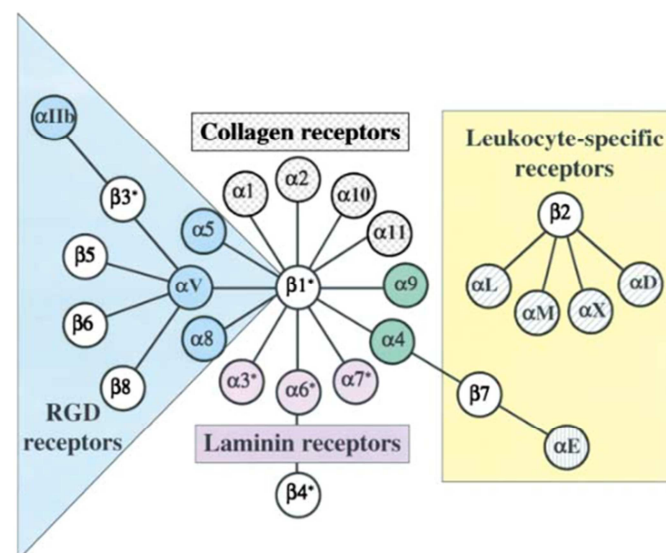


Figure 2 : Schéma des différentes sous-unités α et β des intégrines

d'après Hynes RO. Integrins : bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 20 :110(6) :673-87, 2002.

Les intégrines sont une famille de récepteurs hétérodimériques de 200 à 350 kDa [24]. Il s'agit de glycoprotéines transmembranaires constituées d'une sous-unité alpha et d'une sous-unité beta. On dénombre 24 intégrines différentes résultant des différentes associations possibles entre 18 sous-unités alpha et 8 sous-unités beta [24,25] (**Figure 2**).

Table 1. Integrin Gene Knockout Phenotypes			
$\alpha 1$	V, F	No immediately obvious developmental defects, reduced tumor vascularization	Gardner et al., 1996; Pozzi et al., 2000, 2002
$\alpha 2$	V, F	Few immediately obvious developmental defects, delayed platelet aggregation and reduced binding to monomeric collagen, reduced mammary gland branching	Holtkotter et al., 2002; Chen et al., 2002
$\alpha 3$	P	Kidney tubule defects, reduced branching morphogenesis in lungs, mild skin blistering, lamination defects in neocortex	Kriedberg et al., 1996; DiPersio et al., 1997; Anton et al., 1999
$\alpha 4$	E11/14	Defects in placenta (chorioallantoic fusion defect) and heart (epicardium, coronary vessels). Chimeras show defects in hematopoiesis.	Yang et al., 1995; Arroyo et al., 1996, 1999
$\alpha 5$	E10-11	Defects in mesoderm (posterior somites) and vascular development, neural crest apoptosis. Chimeras show muscular dystrophy	Yang et al., 1993; Goh et al., 1997; Taverna et al., 1998
$\alpha 6^a$	P	Severe skin blistering, other epithelial tissues also defective. Lamination defects in cortex and retina.	Georges-Labouesse et al., 1996, 1998
$\alpha 7$	V, F	Muscular dystrophy, defective myotendinous junctions	Mayer et al., 1997
$\alpha 8$	P	Small or absent kidneys, inner ear hair cell defects	Muller et al., 1997; Littlewood Evans et al., 2000
$\alpha 9$	V	Die within 10 days of birth, chylothorax due to lymphatic duct defect	Huang et al., 2000
$\alpha 10$		Not reported	
$\alpha 11$		Not reported	
αv	E10/P	Two classes: embryonic lethality due to placental defects, perinatal lethality with cerebral vascular defects probably due to neuroepithelial defects, cleft palate. Most blood vessels develop normally	Bader et al., 1998; McCarty et al., 2002
αIIb^b	V, F	Hemorrhage, no platelet aggregation	Tronik-Le Roux et al., 2000
αL	V, F	Impaired leukocyte recruitment	Schmits et al., 1996
αM	V, F	Defective phagocytosis and apoptosis of neutrophils, mast cell development defects, adipose accumulation.	Coxon et al., 1996; Tang et al., 1997; Dong et al., 1997
αX		Not reported	
αD		Not reported	
αE	V, F	Greatly reduced numbers of intraepithelial lymphocytes.	Schon et al., 1999
$\beta 1$	E6.5	Peri-implantation lethality, ICM deteriorates, embryos fail to gastrulate. Extensive analyses of chimeras.	Fässler and Meyer, 1995; Stephens et al., 1995; Brakebusch et al., 1997
$\beta 2^c$	V, F	Leukocytosis, impaired inflammatory responses, skin infections, T cell proliferation defects	Scharffetter-Kochanek et al., 1998
$\beta 3^b$	V, F	Hemorrhage, no platelet aggregation, osteosclerosis, hypervascularisation of tumors	Hodivala-Dilke et al., 1999; McHugh et al., 2000; Reynolds et al., 2002
$\beta 4^a$	P	Severe skin blistering, other epithelial tissues also defective	van der Neut et al., 1996; Dowling et al., 1996
$\beta 5$	V, F	No immediately obvious developmental defects	Huang et al., 2000
$\beta 6$	V, F	Inflammation in skin and airways, impaired lung fibrosis—all probably due to failure to activate TGF β	Huang et al., 1996; Munger et al., 1999
$\beta 7$	V	Deficits in gut-associated lymphocytes—no Peyer's patches, reduced intraepithelial lymphocytes (IEL).	Wagner et al., 1996
$\beta 8$	E10/P	Two classes: embryonic lethality due to placental defects, perinatal lethality with cerebral vascular defects probably due to neuroepithelial defects. Most blood vessels develop normally.	Zhu et al., 2002

Reference citations are listed but not given in the reference list. They can be found in PubMed or in several extensive reviews, which also discuss the implications of the results as well as work with chimeric mice and recent work using conditional and tissue-specific ablation of integrins (Hynes, 1996; De Arcangelis and Georges-Labouesse, 2000; Sheppard, 2000; Bouvard et al., 2001).

Abbreviations: E, embryonic lethal (day of lethality); P, perinatal lethal; V, viable; F, fertile.

^{a,b,c} Human mutations in these genes lead to disease (Hogg and Bates, 2000)

^a $\alpha 6\beta 4$ Epidermolysis bullosa (JEB-PA)—skin blistering (Pulkkinen and Uitto, 1999)

^b $\alpha IIb\beta 3$ Glanzmann thrombasthenia (GT)—bleeding (Kato, 1997)

^c $\beta 2$ Leukocyte adhesion deficiency (LAD)—failure in leukocyte recruitment (Etzioni et al., 1999)

Tableau 1: Présentation du rôle des intégrines

d'après Hynes RO. Integrins : bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 20 :110(6) :673-87, 2002.

Elles participent aux processus de migration, d'interaction et d'adhésion cellulaires avec les protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, la vitronectine, le facteur von Willebrand, la thrombospondine, le fibrinogène, la laminine, l'ostéopontine et le collagène. Pour 8 de ces intégrines, cette interaction requiert une séquence spécifique Arg-Gly-Asp (RGD). Suite à cette étape de reconnaissance, il se produit une modification de l'organisation du cytosquelette (microfilaments d'actine) et une activation de signaux cellulaires. Les intégrines interagissent avec des récepteurs à activité tyrosine kinase (récepteurs à l'EGF (Epidermal Growth Factor), au PDGF, au VEGF, à l'insuline) (**Tableau 1**). En effet, l'activation des intégrines, suite à l'interaction avec leurs ligands, les conduit à se clustériser et à activer des voies de transduction intracellulaire. Cette activation des voies de signalisation est médiée par les extrémités cytoplasmiques des intégrines. Celles-ci ne possèdent pas d'activité enzymatique intrinsèque, mais peuvent interagir avec des protéines adaptatives (taline, vinculine...), et conduire à la connexion au cytosquelette, aux kinases et aux récepteurs de facteurs de croissance. Par exemple, une des protéines activées est la FAK (Focal Adhesion Kinase), qui s'autophosphoryle suite à l'interaction avec les extrémités cytoplasmiques des intégrines réunies en cluster. L'activation peut aussi concerner l'oncogène Ras ou la PI3-K (Phosphatidyl-Inositol 3- Kinase).

Grâce à l'établissement d'une connectivité cellule-cellule et cellule-matrice, les fonctions physiologiques des intégrines sont multiples : survie, croissance et différenciation cellulaires, remodelage osseux, cicatrisation [26]. Toutefois, ces récepteurs sont également impliqués dans des événements pathologiques : athérosclérose, microangiopathies, invasion cellulaire, thrombose et angiogenèse tumorale, dysfonctionnement immunitaire [27].

Plus particulièrement, l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle prépondérant dans les phénomènes d'invasion, la régulation de la croissance tumorale et le potentiel métastatique. Cette intégrine intervient également lors de situations non pathologiques. Elle est fortement exprimée sur les cellules endothéliales lors de l'angiogenèse, mais peu ou pas sur les cellules endothéliales quiescentes [23]. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est donc impliquée dans l'élaboration des néovaisseaux irriguant la tumeur, mais aussi dans la dissémination de métastases, avec une surexpression à la surface des cellules tumorales, en particulier de cancers agressifs, ce qui en fait une cible de choix pour l'imagerie. Lors de la progression tumorale, les cellules cancéreuses tendent à perdre les intégrines favorisant leur adhésion à la membrane basale ou limitant leur différenciation. Au contraire, elles surexpriment d'autres intégrines, comme $\alpha_v\beta_3$, qui

stimulent notamment la survie et la prolifération cellulaires, ce que l'on retrouve par exemple dans les mélanomes et les glioblastomes [28].

1.3.3. Le facteur induit par l'hypoxie (HIF-1 α)

L'hypoxie est un stimulus très important de l'expansion vasculaire. Le maître d'œuvre de ce processus est le facteur HIF. En situation d'hypoxie ou en cas de mutation d'HIF α , les sous-unités α et β de HIF s'associent et leur translocation nucléaire permet l'interaction avec des promoteurs de gènes codant pour des facteurs pro-angiogéniques tels que VEGF et PDGF. Leur effet coordonné a pour but de rétablir au plus vite la normoxie cellulaire.

1.3.4. Les autres facteurs de l'angiogenèse

1.3.4.1. Le facteur de croissance fibroblastique (FGF)

Cette appellation correspond à plus d'une vingtaine de protéines, mais la plus importante est le facteur de croissance fibroblastique basique, bFGF. Ce facteur est synthétisé par les cellules endothéliales et les cellules musculaires lisses, puis est stocké dans la matrice extracellulaire. Il agit *via* des récepteurs spécifiques à activité tyrosine kinase FGFR-1 et FGFR-2 (Fibroblast Growth Factor Receptors). Il stimule l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et entraîne l'expression de molécules anti-apoptotiques, telles que bcl-2 et la survivine.

1.3.4.2. Les métalloprotéases matricielles

Les métalloprotéases matricielles (MMP) constituent une famille de plus d'une vingtaine d'endopeptidases impliquées dans la dégradation de plusieurs composants de la matrice extracellulaire, et dans le remodelage des tissus [29]. Elles sont synthétisées par les cellules endothéliales, les macrophages, les cellules musculaires lisses et les lymphocytes. Ces enzymes sont peu ou pas exprimées au niveau des tissus sains quiescents. Leur présence est clairement augmentée lors de processus de remaniement tissulaire, physiologique (croissance, développement) ou pathologique (tissus malins par exemple). Ces protéases sont zinc dépendantes. Elles sont sécrétées sous forme de pro-MMP inactives par les cellules stromales, puis activées par clivage d'un pro-peptide en N-terminal. Cette activation peut avoir lieu dans le milieu extracellulaire, à la surface des cellules ou bien dans le cytoplasme.

Les MMP peuvent être classées en 6 groupes selon notamment leurs différences structurales. On distingue les collagénases (MMP-1, -8 et -13), les gélatinases (MMP-2 et -9), les stromélysines (MMP-3 et -10), les matrilysines (MMP-7 et -26), les métalloprotéases transmembranaires (MMP-14, -15, -16, -17, -24, et -25), et un groupe hétérogène (MMP-12, -18, -19, -20, -21, -22, -23A/B, -27, et -28).

Leur activité est régulée au niveau transcriptionnel par des cytokines (IL-1, bFGF) et des inhibiteurs spécifiques, les TIMP (Tissue inhibitors of metalloproteases) [30]. Ces derniers forment des complexes avec les MMP et régulent leur activation ainsi que leur activité.

L'activation des MMP, en collaboration avec différentes molécules transmembranaires telles que les intégrines, participe au processus de survie, de migration et de prolifération cellulaires.

Ces enzymes interviennent lors de divers phénomènes physiologiques comme l'angiogenèse, l'embryogenèse, la réparation tissulaire ou encore la cicatrisation cutanée. Lors de certaines maladies, il est possible d'observer une forte augmentation de leur expression conduisant à une activité protéolytique accrue, ou au contraire une limitation de leur expression à l'origine d'une accumulation de matrice extracellulaire. Elles sont par conséquent impliquées dans les microangiopathies (rétinopathie diabétique), les maladies cardiovasculaires, digestives, tumorales ou inflammatoires chroniques (asthme, glomérulonéphrite, etc) [31].

Concernant les pathologies cancéreuses, elles favorisent des phénomènes de perte d'adhérence, d'invasion et de prolifération des cellules tumorales [32–34]. Les MMP sont aussi susceptibles de stimuler l'angiogenèse, et l'intravasation, l'extravasation ainsi que la croissance de tumeurs métastatiques [35–37].

L'action des gélatinases est dirigée contre le collagène interstitiel dénaturé ou gélatine et les collagènes de type IV et V de la membrane basale. L'expression de la MMP-9 est limitée dans les tissus normaux, et le plus souvent associée aux monocytes et aux macrophages. On trouve néanmoins des traces de son expression dans les tubules rénaux normaux, dans les hépatocytes, dans les spermatides, dans les myocytes, dans les cellules pariétales de l'estomac, dans l'épithélium colonnaire de la prostate et dans les cellules utérines. La production de cette métalloprotéase est cependant stimulée lors de remodelage tissulaire,

comme durant le développement embryonnaire, la cicatrisation de plaies ou l'invasion tumorale. Elle est dans ce cas produite par les cellules stromales ou par les cellules malignes [38]. Au niveau tumoral, les expressions de MMP-2 et MMP-9 sont accrues en particulier au niveau des zones d'invasion.

1.3.4.3. Les angiopoïétines

L'angiopoïétine est spécifique de l'endothélium vasculaire et existe sous deux formes Ang-1 et Ang-2. Elles se lient aux récepteurs TIE-1 et TIE-2 à activité tyrosine kinase. Ang-1 est un facteur de quiescence et favorise une activité anti-apoptotique. En l'absence de VEGF, Ang-2 agit comme un antagoniste de Ang-1. Cette forme conduit à la régression des vaisseaux. Toutefois, en présence de VEGF, Ang-2 favorise la phase d'activation de l'angiogenèse avec le bourgeonnement vasculaire, la réparation et le remodelage tissulaire.

1.3.4.4. Les facteurs anti-angiogéniques

L'angiostatine, l'endostatine et la thrombospondine-1 s'opposent à la prolifération des cellules endothéliales, en ciblant le bFGF, les intégrines $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$ ou en induisant l'expression de TGF- β . Elles jouent un rôle important dans l'inhibition du développement métastatique.

1.4. Les traitements anti-angiogéniques

L'inhibition de la néoangiogenèse constitue une approche thérapeutique nouvelle dans les processus cancéreux et métastatiques [39]. La prolifération d'une tumeur ne peut se concevoir sans le développement d'une vascularisation appropriée, qu'il s'agisse du détournement de vaisseaux préexistants à son profit ou de la formation *de novo* de vaisseaux tumoraux. J. Folkman en 1971 a alors émis l'hypothèse qu'en détruisant les vaisseaux irriguant la tumeur, il serait possible de stopper la croissance des cellules cancéreuses ou, au moins, de stabiliser la tumeur [40].

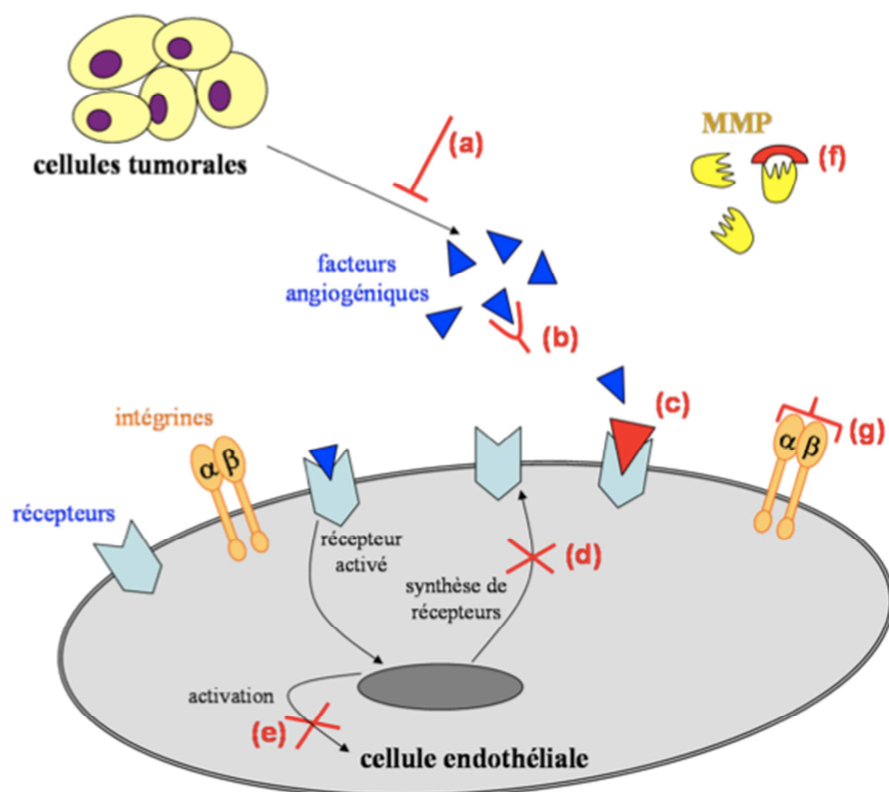


Figure 3 : Les différents niveaux d'inhibition de l'angiogenèse tumorale : (a) inhibition de la synthèse des facteurs angiogéniques par les cellules tumorales, (b) blocage des facteurs angiogéniques, (c) compétition au niveau des récepteurs, (d) inhibition de la synthèse de récepteurs, (e) inhibition de l'activation des cellules endothéliales, (f) blocage des métalloprotéases, (g) blocage des intégrines

d'après Auffer, M. Chimiothèque de complexes du technétium et du rhénium ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$: développement de traceurs pour la détection précoce de la néoangiogenèse tumorale. Doctorat Biochimie. Université Paris Sud 11; 13 novembre 2008.

Cette hypothèse repose sur le concept de normalisation de la vascularisation. Jain R. a suggéré que les traitements anti-angiogéniques supprimeraient les capillaires immatures et régulariseraient l'architecture des autres vaisseaux, favorisant le retour vers la normale de la pO_2 , de la pression interstitielle et un meilleur apport de produits anti-cancéreux. Les traitements anti-angiogéniques ont donc démontré une action synergique en association avec des traitements conventionnels de chimiothérapie et/ou de radiothérapie, même lors du traitement de patients métastatiques lourdement prétraités [41]. La dépendance des tumeurs vis-à-vis de l'angiogenèse fait des néovaisseaux une cible thérapeutique de choix dans le traitement des cancers. Cette cible est aisément accessible et les agents anti-angiogéniques sont applicables à de nombreux types tumoraux. Il existe différents niveaux d'intervention pour neutraliser les facteurs angiogéniques (**Figure 3**) : inhiber leur synthèse au niveau tumoral, les bloquer à l'aide d'anticorps solubles neutralisants par exemple, ou bloquer

l'interaction avec leur récepteur. Dans la cellule endothéliale, il est possible d'inhiber le signal d'activation induit par les facteurs angiogéniques, mais aussi d'empêcher la synthèse des récepteurs ou d'inhiber directement l'activation de ces cellules endothéliales. Enfin, de manière spécifique, il est également envisageable de bloquer les intégrines ou les métalloprotéases. Un certain nombre de traitements sont détaillés ci-dessous.

1.4.1. Les anti-VEGF

1.4.1.1. Les anticorps monoclonaux

Les traitements anti-VEGF s'attaquent aux cellules endothéliales activées par le VEGF et ne concernent donc pas l'endothélium normal quiescent.

Le bevacizumab (Avastin[®], Roche) a été le premier agent anti-angiogénique commercialisé en France dès 2005. C'est un anticorps monoclonal humanisé anti-VEGF (dirigé contre VEGF-A) bloquant les différentes isoformes du VEGF avec une haute affinité, empêchant l'interaction de ce facteur avec ses différents récepteurs VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 à la surface des cellules endothéliales. Différentes études de phase III ont établi que son administration en combinaison avec des agents chimiothérapeutiques permet d'augmenter de plusieurs mois la survie ou la survie sans progression des patients atteints de cancer colorectal métastatique, de cancer du sein métastatique, de cancer pulmonaire non à petites cellules, de cancer du rein, et plus récemment de glioblastome [42–47]. Ce traitement est également indiqué dans la prise en charge thérapeutique des cancers des ovaires, péritonéaux, des trompes de Fallope et du col utérin.

D'autres stratégies thérapeutiques issues d'anticorps ont également été conçues. Le ranibizumab (Lucentis[®], Novartis), par exemple, est un fragment d'anticorps monoclonal humanisé recombinant dirigé contre VEGF-A. Il est indiqué dans la prise en charge thérapeutique de la néovascularisation choroïdienne retrofovéolaire en cas de DMLA (Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age). De même, le ramucirumab (Cyramza[®], Lilly) est un anticorps humain bloquant le VEGFR-2. Il est indiqué dans le traitement des cancers gastriques et des adénocarcinomes de la jonction gastro-œsophagienne.

1.4.1.2. Certains inhibiteurs de tyrosine kinase

La seconde classe d'anti-angiogéniques est constituée des inhibiteurs à spectre plus ou moins large de l'activité tyrosine-kinase des récepteurs du VEGF. La plupart sont des inhibiteurs compétitifs de l'ATP (Adénosine TriPhosphate) et présentent une forte affinité pour des membres additionnels de la famille des tyrosine-kinases tels que les récepteurs du facteur de croissance plaquettaire (PDGFR α et PDGFR β), le récepteur du facteur de croissance épidermique (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR), du récepteur KIT du facteur de cellules souches (Stem Cell Factor, SCF), ou du récepteur RET (REarranged during Transfection) du facteur neurotrophique de la lignée gliale (Glial Cell Line Derived Neurotrophic Factor, GDNF). Cette action sur plusieurs voies de signalisation mitogène semble être un avantage thérapeutique. Elle conduit à l'inhibition non seulement de l'angiogenèse, mais également de la prolifération tumorale [48]. Toutefois, le risque de survenue d'effets indésirables est lui aussi d'autant plus élevé.

Divers inhibiteurs de tyrosine kinase sont désormais commercialisés. Le sunitinib (Sutent[®], Pfizer) et le sorafenib (Nexavar[®], Bayer Santé), inhibiteurs multikinases, sont tous les deux indiqués pour le traitement du cancer du rein en monothérapie par voie orale. Le sunitinib est aussi utilisé pour le traitement des tumeurs stromales gastro-intestinales (Gastro-Intestinal Stromal Tumor, GIST) et du cancer du pancréas. Le sorafenib a la propriété particulière d'inhiber également la voie des MAP-kinases (Mitogen Activated Protein, MAP). Il est également prescrit pour le traitement du carcinome hépatocellulaire et le carcinome thyroïdien.

D'autres inhibiteurs de tyrosine kinase sont d'ores et déjà commercialisés (**Tableau 2**) et certains font actuellement l'objet d'études (cediranib, linifanib, etc...).

Dénomination commune internationale	Spécialité	Cible pharmacologique	Indications
Axitinib	Inlyta [®] (Pfizer)	VEGFR-1/2/3	Adénocarcinome rénal
Lenvatinib	Lenvima [®] (Eisai SA)	VEGFR-1/2/3 FGFR-1/2/3/4 PDGFR- α/β KIT, RET	Carcinome thyroïdien (ATU)
Nintedanib	Ofev [®] (Boehringer Ingelheim International)	PDGFR- α/β FGFR-1/3 VEGFR-1/3 Flt-3, Lck, Lyn, Src	Fibrose pulmonaire interstitielle diffuse
Pazopanib	Votrient [®] (Novartis)	VEGFR-1/2/3 PDGFR- α/β c-KIT	Cancer du rein Sarcomes des tissus mous
Regorafenib	Stivarga [®] (Bayer)	VEGFR-1/2/3, TIE2 KIT, RET, RAF-1, BRAF, BRAF ^{V600E} PDGFR, FGFR KIT mutée	Cancer colorectal métastatique GIST maligne
Vandetanib	Caprelsa [®] (AstraZeneca)	VEGFR-2 EGFR RET récepteur 3 de la tyrosine kinase de l'endothélium vasculaire	Cancer médullaire de la thyroïde

Tableau 2 : inhibiteurs de tyrosine kinase commercialisés (Vidal, thériaque)

1.4.2. Les antagonistes de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

L'intégrine $\alpha_v\beta_3$, récepteur de protéines de la matrice extracellulaire dont la vitronectine, n'est exprimée que dans les vaisseaux en formation, et constitue donc une cible intéressante pour une thérapie anti-angiogénique [49].

En se basant sur les propriétés anti-angiogéniques de l'anticorps LM609 murin anti- $\alpha_v\beta_3$ humaine, différentes molécules ont été développées. L'intetumumab (CNTO-95), ciblant $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_v\beta_5$, a donné des résultats satisfaisants dans la prise en charge de carcinosarcome ovarien [50]. De même, la vintaxine, anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, est une forme humanisée de seconde génération de l'anticorps murin LM609. Cet anticorps, malgré une bonne tolérance n'a pas démontré une efficacité suffisante lors d'essais cliniques de phase I/II dans la prise en charge de pathologie à un stade avancé [51].

L'etaracizumab (Abegrin[®], MEDI-522) est un anticorps humanisé issu des travaux sur la vintaxine mais dont le développement a été suspendu suite à des essais cliniques de

phase II décevants en association avec la dacarbazine dans le traitement de mélanomes métastatiques [52,53].

L'abciximab (Reopro[®], chimeric 7E3 Fab) est commercialisé pour la prise en charge des complications cardiaques ischémiques et la réduction du risque d'infarctus du myocarde. Ce médicament correspond au fragment Fab de l'anticorps monoclonal chimérique 7E3. Son action est dirigée contre les intégrines $\alpha_{IIb}\beta_3$ et $\alpha_v\beta_3$.

Différentes pistes ont aussi été explorées. L'ATN-161, un peptide ne reposant pas sur la structure peptidique RGD [52]. Il s'agit d'un dérivé de la fibronectine qui se lie aux intégrines $\alpha_v\beta_3$ et $\alpha_5\beta_1$ [54]. Les disintégrines, qui, elles reposent sur la structure RGD ont donné lieu au développement de composés L000845704 et SB273005, évalués notamment dans le traitement de l'ostéoporose.

Le cilengitide (Merck) est un petit peptide contenant le motif RGD : c-[RGDf(N-Me)V-]. Il s'agit d'un antagoniste sélectif de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et pour une moindre part de l'intégrine $\alpha_v\beta_5$. Ce peptide a fait l'objet d'études dans le cadre du traitement du gliome, du glioblastome, du cancer de la prostate et du mélanome. Le cilengitide a disposé d'une autorisation temporaire d'utilisation nominative (ATU) pour la prise en charge thérapeutique des glioblastomes. Son développement a connu un temps d'arrêt suite à l'absence d'amélioration de la survie globale en association à la radio-chimiothérapie par temozolomide lors d'essais de phase III chez des patients souffrant de gliome de haut grade.

En thérapie, une autre approche consiste en l'utilisation de peptides RGD couplés à des radio-isotopes émetteurs β^- tels que l'yttrium 90. Il s'agit d'une radiothérapie métabolique ciblant de manière spécifique les molécules, qui interviennent lors des processus de migration, de croissance et de différenciation cellulaires, en vue d'obtenir une régression tumorale. Le cilengitide a été associé au ^{90}Y -DOTA-ChL6 et administré chez la souris nude porteuse de tumeur du sein bcl-2 positive. Les résultats dévoilent une régression tumorale avec apoptose des cellules endothéliales et tumorales, plus importante chez la souris traitée par l'association, que chez la souris traitée uniquement par radio-immunothérapie, c'est à dire sans l'agent anti-angiogénique. Des essais cliniques de phase I ont été réalisés dans le traitement des tumeurs solides, et des études ont été menées dans le cancer pulmonaire non à petites cellules [55].

1.4.3. Les inhibiteurs de métalloprotéases matricielles

Différentes approches ont ainsi été développées pour interférer avec l'expression ou l'activation des MMP. La méthode principale réside dans l'emploi d'inhibiteurs synthétiques qui interagissent directement avec le site catalytique de ces enzymes pour bloquer de façon réversible leur activité protéolytique. Des molécules de grande affinité ont été synthétisées et peuvent être classées en plusieurs catégories.

La première génération est constituée d'inhibiteurs pseudo-peptidiques, qui entrent en compétition avec le substrat des MMP, et se lient au site catalytique de l'enzyme par chélation de l'atome de zinc. Il s'agit de dérivés hydroxamates. Le batimastat a fait l'objet d'essais cliniques de phase III, mais n'a pas été commercialisé du fait d'une biodisponibilité limitée *per os*. Le marimastat (Vernalis) malgré une administration possible par voie orale, n'a pas donné de résultats satisfaisants, seul ou en association avec la gemcitabine. Ces inhibiteurs ont présenté un manque de sélectivité vis-à-vis du type de MMP à cibler. Leur action, portant sur de multiples MMP, est à l'origine d'effets indésirables importants, ce qui a conduit pour l'essentiel à l'arrêt de leur développement.

Afin d'améliorer la sélectivité et la pharmacocinétique, de nouveaux composés non peptidiques ont été développés en se basant par exemple sur l'analyse tridimensionnelle par cristallographie du site catalytique. Le spectre est donc plus sélectif. L'activité est alors plus faible vis-à-vis de MMP-1, mais augmentée pour des cibles d'intérêt comme MMP-2 et MMP-9 [29,56]. Différentes structures chimiques ont été utilisées, qu'ils s'agissent d'hydroxamates de nouvelle génération, de dérivés thiol, pyrimidine, hydroxypyronone ou phosphore. Les principales molécules sont le prinomastat (Pfizer), le tanomastat ou BAY 12-9566[®] (Bayer, essais suspendus), le CGS-27023[®] (Novartis), ou le rebimastat (Bristol-Myers Squibb, BMS) [29,56,57].

Les dérivés des tétracyclines constituent également une catégorie de traitement envisagée pour inhiber les MMP. Cette classe de médicament comprend des antibiotiques classiques comme la tétracycline, la doxycycline et la minocycline mais aussi de nouveaux analogues tels que le metastat (Col-3, Collagenex Pharmaceuticals). Ces molécules agissent de façon multiple, par chélation du zinc du site catalytique, en diminuant l'expression des MMP, en interférant avec l'activité protéolytique des proenzymes, et en diminuant leur

dégradation. Le Periostat, contenant de la doxycycline, est le seul inhibiteur approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) américaine pour le traitement des parodontites [56,58].

Des anticorps correspondent également à une piste thérapeutique dans le ciblage des MMP. On peut notamment citer le REGA-3G12, conçu pour être un inhibiteur sélectif de la MMP-9 [59].

Le CGS 27023A est un inhibiteur de MMP. Différents traceurs ont été synthétisés à partir de cette molécule. Le ^{123}I -HO-CGS 27023A présente une bonne affinité *in vitro* pour les MMP-2 et MMP-9 [60,61]. D'autres pistes concernent les inhibiteurs endogènes de MMP. De nouvelles molécules sont en cours de développement et s'inspirent par exemple de l' α 2-macroglobuline, capable de se complexer avec les MMP, ou des TIMP qui interagissent de façon non covalente avec le site catalytique de ces protéases [62].

Les inhibiteurs de MMP ont démontré qu'ils étaient d'autant plus efficaces qu'ils étaient utilisés précocement en termes de progression tumorale. Leur utilisation seule ou en association avec une chimiothérapie est susceptible d'être testée à un stade précoce de la pathologie ou chez des patients en rémission [63].

1.4.4. Les autres traitements

De multiples stratégies d'action ont été étudiées [64,65]. Il est possible de citer le pegaptanib (Macugen[®], Pfizer), un oligonucléotide pégylé ciblant le VEGF₁₆₅, l'aflibercept (Zaltrap[®], Novartis), un VEGF-trap, c'est à dire une protéine de fusion piégeant le VEGF et comprenant des parties du VEGFR-1 et du VEGFR-2, ou l'angioccept[®] (Bristol-Myers Squibb), une « adnectine » inhibitrice sélective du VEGFR-2 [66].

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est lui aussi une cible thérapeutique. Divers anticorps monoclonaux ont été développés tels que le cetuximab (Erbix[®]) et le panatumumab (Vectibix[®]) mais aussi des inhibiteurs de tyrosine kinases comme l'afatinib (Giotrif[®]), le lapatinib (Tyverb[®]), l'erlotinib (Tarceva[®]), le gefitinib (Iressa[®]), etc.

Des inhibiteurs de c-Met (Mesenchymal Epithelial Transition), récepteur impliqué dans l'angiogenèse et la motilité cellulaire, sont en cours de développement (ARQ-197, AMG-102, XL-880, XL-184).

L'inhibition directe de la prolifération des cellules endothéliales a également été envisagée avec un agent anti-prolifératif, le TNP-470 (TAP Pharmaceuticals).

Le ciblage de la protéine kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) permet d'abaisser les concentrations des facteurs HIF et VEGF au niveau de la tumeur et de son microenvironnement. Il est donc possible d'apprécier les effets anti-angiogéniques du temsirolimus (Torisel[®]) de l'everolimus (Afinitor[®]) ou du sirolimus (Rapamune[®]).

D'autres molécules ont été étudiées comme la thrombospondine-1, l'angiostatine, l'endostatine ou la vasohibine et les interférons α et β (IFN α et β), la thalidomide et le lenalidomide.

1.5. L'imagerie de l'angiogenèse

L'essor des thérapies ciblées nécessite la mise au point concomitante de techniques d'imagerie de sensibilité et spécificité adaptées. Le développement des traitements anti-angiogéniques requiert en effet des outils permettant l'adaptation des posologies, la sélection de patients susceptibles de répondre aux traitements, et capables de fournir une information pronostique et diagnostique quant à l'évolution de la pathologie.

Avant de détailler les diverses pistes envisagées pour explorer la néoangiogenèse, il apparaît nécessaire de présenter les différents types d'imagerie. En fonction des modalités d'imagerie et donc des principes physiques utilisés, il est possible d'en distinguer trois.

Dans un premier temps, l'imagerie morphologique ou anatomique s'attelle à étudier la structure et donc la morphologie de l'organisme. La résolution spatiale est un paramètre primordial et les techniques alors privilégiées sont la tomodensitométrie (TDM), l'imagerie par résonance magnétique (IRM), et l'échographie.

Ensuite, l'imagerie fonctionnelle vise à étudier des processus physiologiques ou pathologiques. Elle permet de détecter des dysfonctionnements qui vont précéder la survenue d'anomalies morphologiques. Ceci offre donc une information précoce contrairement à l'imagerie anatomique, qui se limite à révéler les conséquences morphologiques des pathologies. L'élément crucial est cette fois-ci la spécificité du traceur ciblant le processus physiologique, sur laquelle repose la puissance de la technique. Longtemps réservée à

l'imagerie isotopique, cette imagerie fonctionnelle devient désormais accessible aux autres modalités.

Enfin, l'imagerie moléculaire tend à s'intéresser aux gènes et aux protéines. Elle est proche de l'imagerie fonctionnelle. Toutefois, l'imagerie moléculaire visualise directement des désordres génomiques ou protéiques, en ciblant par exemple des récepteurs cellulaires.

Ces trois types d'imagerie se complètent voire s'unissent pour une meilleure compréhension des phénomènes physiologiques et pathologiques.

Aussi, de multiples modalités d'imagerie existantes ou en phase de développement sont utilisées afin d'observer les vaisseaux tumoraux et de caractériser les tumeurs solides.

Nous avons ici répertorié les principales avancées de l'imagerie morphologique (IRM, TDM, échographie, optique) et moléculaire (TEP, TEMP) permettant de visualiser le processus de néoangiogenèse. En outre, l'avenir appartient à l'exploration multimodale associant par exemple imagerie anatomique, fonctionnelle et métabolique.

Différents acteurs du processus angiogénique ont été explorés : les ligands de la fibronectine et du VEGF, les inhibiteurs de métalloprotéases, et les ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [5]. Les enjeux de l'imagerie moléculaire, essentiellement représentée par l'imagerie isotopique, sont de permettre la détection précoce des tumeurs, la mise au point de nouvelles techniques de caractérisation non-invasives pour améliorer le diagnostic et évaluer l'efficacité du traitement.

1.5.1. L'imagerie par résonnance magnétique (IRM)

L'IRM apporte une imagerie morphologique et fonctionnelle, notamment par l'utilisation d'agents de contraste fonctionnalisés (anticorps monoclonal, liposomes). Cette technique non irradiante, est largement utilisée lors du bilan d'extension locale des cancers du sein et du cerveau, et apporte des informations spécifiques relatives à l'angiogenèse tumorale. L'agent de contraste le plus utilisé est le gadolinium associé à l'acide diéthyltriamine penta-acétique (Gd-DTPA). Celui-ci diffuse rapidement dans les espaces interstitiels et permet de déterminer la perfusion tissulaire, la fraction du volume vasculaire et la perméabilité. Le gadolinium-DTPA est capable de pénétrer la paroi vasculaire et distinguer le tissu sain (non fuyant) du tissu malin (fuyant), reflétant l'hyperperméabilité des vaisseaux [67,68]. L'IRM

offre un certain nombre d'avantages avec par exemple une bonne pénétration en profondeur pour une résolution généralement supérieure à celle de la TEP. Toutefois, cette technique toujours très coûteuse, n'est pas entièrement quantitative et présente une plus faible spécificité. En effet, elle ne permet pas une réponse linéaire entre signal et concentration en agents de contraste. Les résultats obtenus sont, qui plus est, difficilement comparables entre établissements, du fait de variabilités entre les machines et entre les différents protocoles. Enfin, un autre inconvénient par rapport à la TEP est la moindre sensibilité en termes de détection de traceurs.

Le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en IRM fait l'objet de recherches précliniques. Il est envisagé l'utilisation d'anticorps monoclonaux (anticorps monoclonal LM609) [69], de mimes peptidiques de RGD, liés à des structures liposomales paramagnétiques ou des nanoparticules super-paramagnétiques d'oxyde de fer (Super Paramagnetic Iron Oxide, SPIO) [70–72]. Des nanoparticules coatées à l'aide d'oxyde de fer et couplées au DOTA ont été utilisées pour de l'imagerie bimodale IRM/TEP [73]. Enfin, le RGD-CLIO-Cy5.5 permet le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ selon deux modalités (IRM et fluorescence), combinant haute résolution spatiale (IRM) et forte sensibilité (fluorescence) [74].

1.5.2. L'imagerie par ultrasons

Cette technique, également non irradiante, repose sur la réflexion des ultrasons par les différents tissus de l'organisme. Les limites de cette méthode sont sa dépendance vis-à-vis de l'opérateur, la faible profondeur de champ et le fait que toutes les parties du corps ne sont pas visualisables (poumons, os, cerveau). L'échographie de contraste (Contrast Enhanced UltraSonography, CEUS) fait intervenir des produits de contraste échographiques ce qui permet d'accroître la sensibilité. Il s'agit de suspensions isotoniques inertes de microbulles augmentant l'échogénicité du compartiment sanguin. Leur explosion permet d'obtenir une meilleure résolution de l'arbre vasculaire [74]. Le Doppler US détecte la fréquence des mouvements du sang et permet d'estimer le flux et le volume sanguins. L'étude de l'angiogenèse tumorale en écho-doppler est utilisable dans le cadre de tumeurs superficielles comme les mélanomes et le cancer du sein.

Le ciblage spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est étudié *in vitro* et *in vivo* à l'aide d'agents de contraste contenant notamment le motif RGD ou l'échistatine (toxine de venin de serpent possédant plusieurs sites RGD). Targeson *et al* ont ainsi développé le Visistar[®] Integrin, une

microbulle perfluorocarbonée encapsulée dans une structure lipidique porteuse de séquences RGD [75].

1.5.3. La tomodensitométrie par rayons X (ou scanner, Computed Tomography, CT)

Cette technique d'imagerie repose sur la différence d'atténuation de rayons X traversant l'organisme. Tout comme l'IRM, il s'agit ici d'une technique d'imagerie morphologique ou anatomique qui étudie la structure et la morphologie de l'organisme. L'injection de produits de contraste iodés est possible et a pour but d'améliorer la sensibilité. Cette modalité d'imagerie s'avère irradiante même si les paramètres d'acquisition et les algorithmes de reconstruction tendent à limiter l'irradiation aujourd'hui. Au niveau tumoral, les informations obtenues sont diverses : le volume sanguin, la perméabilité capillaire, le flux sanguin tissulaire, le temps de transit...

1.5.4. L'imagerie optique

Cette technique se voit limitée par sa faible capacité d'analyse en profondeur (souvent infra-millimétrique). L'imagerie IR (Infra-Rouge) ou proche IR repose sur l'étude de l'absorbance par les tissus de rayonnements de longueurs d'ondes comprises entre 600 et 2400 nm. La fluorescence et la bioluminescence utilisent des sondes spécifiques couplées à des systèmes de détection, tels que la Green Fluorescent Protein (GFP) ou la luciférase. Limitées par leur faible capacité de pénétration, un contraste réduit et par le phénomène d'auto-fluorescence, elles sont surtout utilisées pour les études précliniques chez l'animal et les tissus superficiels ou alors en combinaison avec l'endoscopie [76].

Les principaux axes de recherche, actuellement en cours d'étude chez l'animal, sont la tomographie par fluorescence et l'utilisation de points quantiques (Quantum Dots, QD) [77]. Le premier permet une imagerie tridimensionnelle et quantitative et nécessite l'intervention de sondes telles que le multimère Cy5.5-RAFT-c(RGDfK)₄ pour l'angiogenèse [78]. Le second consiste en des nanoparticules semi-conductrices fluorescentes et inorganiques couplées à des ligands pour une imagerie spécifique, comme des peptides RGD [79]. Le développement de technique bimodales est désormais à l'ordre du jour avec le développement par exemple du [⁶⁴Cu]-DOTA-QD-RGD et du [⁶⁴Cu]-BaAnSar-RGD₂-Cy5.5 [80–82].

1.5.5. L'imagerie isotopique

Notre projet se concentre sur la mise au point et la caractérisation de radiotraceurs destinés à l'imagerie isotopique moléculaire de la néoangiogenèse [83]. Il convient donc dans un premier temps d'introduire les bases de la médecine nucléaire et de la radiopharmacie [84].

1.5.5.1. Bases de médecine nucléaire et de radiopharmacie

1.5.5.1.1. Les différentes techniques de détection et d'imagerie isotopique

1.5.5.1.1.1. La tomographie par émission monophotonique (TEMP)

La tomographie par émission monophotonique nécessite l'utilisation de radiotraceurs émetteurs de photons gamma (purs de préférence). Ces photons avec une énergie suffisante sont susceptibles de sortir de l'organisme pour ensuite être détectés par la gamma-caméra. L'essentiel des examens scintigraphiques en TEMP est réalisé à l'aide de technétium 99 métastable (^{99m}Tc). Ses caractéristiques physiques sont idéales. C'est un émetteur gamma pur, dont l'énergie des photons (140,7 KeV) est comprise dans la fenêtre de détection des caméras. Enfin, sa période physique de 6 heures le rend peu irradiant. La résolution spatiale de cette technique est de l'ordre de 6 mm mais tend à s'améliorer avec l'évolution technologique des détecteurs, notamment à semi-conducteurs. La TEMP permet de suivre et de quantifier la répartition tridimensionnelle du médicament radiopharmaceutique.

1.5.5.1.1.2. La tomographie par émission de positons (TEP)

La tomographie par émission de positons (TEP) repose sur l'administration d'un médicament radiopharmaceutique émetteur de positons (rayonnement β^+). Un positon, par annihilation avec un électron (e^-), donne naissance à deux photons de 511 keV émis à 180° l'un de l'autre. Ces photons sont détectés en coïncidence par une couronne de détection. La TEP se caractérise par une meilleure résolution spatiale que la TEMP. Elle est d'environ 3 mm. Les émetteurs de positons sont soit des radio-isotopes d'éléments qui existent dans la plupart des molécules (^{11}C , ^{15}O , ^{13}N), soit des halogènes (^{18}F , ^{76}Br). Les radio-isotopes des éléments constitutifs des molécules sont incorporés aux molécules biologiques ou organiques (médicaments) sans altérer leurs caractéristiques physico-chimiques et biologiques. Aussi, ces émetteurs de positons sont soit utilisés directement après une phase de purification (^{18}F -FNa),

soit servent aux marquages de molécules ($^{15}\text{O-H}_2\text{O}$, ^{18}F -Fluoro-2-désoxy-D-glucose (^{18}F -FDG), ^{18}F -Fluoro-DOPA, ^{11}C -Méthionine). Le ^{18}F -FDG est actuellement le plus utilisé des médicaments radiopharmaceutiques destinés à la TEP. Ces traceurs se distribuent puis sont utilisés par les cellules comme leurs analogues non marqués. Ainsi, la tomographie par émission de positons permet d'étudier quantitativement la distribution tridimensionnelle dans le corps humain de molécules couplées à des émetteurs de positons.

1.5.5.1.2. Les différents radionucléides

Les caractéristiques physiques des radionucléides (nature, énergie du rayonnement, période) conditionnent la dosimétrie, la gestion des déchets et la radioprotection à mettre en œuvre.

1.5.5.1.2.1. Le rayonnement

Le choix du radionucléide est fait en fonction de l'utilisation diagnostique ou thérapeutique du médicament radiopharmaceutique. Les émetteurs gamma (γ) ou bêta plus (β^+) sont utilisés pour la détection externe lors d'explorations fonctionnelles (imagerie TEMP ou TEP respectivement). Pour un usage diagnostique, et concernant le rayonnement γ , les émetteurs γ purs (sans émission β^- associée) sont préférables en termes de radioprotection du patient.

Le rayonnement γ est un rayonnement électromagnétique émis par le noyau. Il est constitué de photons de haute énergie à fort pouvoir pénétrant mais de transfert d'énergie linéique (TEL) faible. Ce rayonnement traduit la désexcitation du noyau permettant le retour à une entité plus stable.

Les rayonnements β^+ (ou positons) interagissent avec les électrons du milieu traversé et s'annihilent en émettant deux photon γ de 511 KeV.

Les émetteurs β^- et alpha (α) génèrent une irradiation localisée utilisée en thérapeutique. Ils génèrent un certain nombre d'ionisations sur leurs parcours, à l'origine d'altérations cellulaires et nucléaires. Le rayonnement alpha est un rayonnement particulaire composé d'un noyau d'hélium (^4_2He) (présentant 2 protons et 2 neutrons), très ionisant et de TEL très élevé. Ce rayonnement est susceptible de délivrer une énergie importante aux tissus (6 - 7 MeV sur une courte distance, 50 à 90 μm). Toutefois, il est peu pénétrant, et peut être arrêté aisément, par exemple, par une feuille de papier. Le rayonnement β^- , pour sa part, se

caractérise par un TEL plus faible, mais un pouvoir de pénétration plus élevé. Le parcours dans la matière est fonction de l'énergie, de quelques μm à 10 mm.

1.5.5.1.2.2.L'énergie du rayonnement

En TEMP, la fenêtre énergétique des radioéléments doit être comprise entre 100 et 300 KeV pour être adaptée aux gamma-caméras. L'énergie doit être suffisamment importante ($> 20 \text{ KeV}$) pour ne pas être absorbée par les tissus et permettre la détection de lésions ou de l'organe cible. Elle doit toutefois être limitée ($< 600 \text{ KeV}$) pour permettre une détection correcte. L'émission optimale pour les caméras TEMP actuelles se situe autour de 150 KeV.

Pour les émetteurs β^+ , le procédé repose sur la détection en coïncidence des deux photons γ d'annihilation de 511 KeV.

Pour ce qui est de la thérapie, l'énergie des radionucléides utilisés varie entre 0,5 et 2 MeV.

1.5.5.1.2.3.La période physique

Les radionucléides se caractérisent par leur période radioactive, c'est à dire le temps au bout duquel l'activité a diminué de moitié. Ils doivent avoir une période physique suffisamment longue pour permettre une exploration correcte d'un organe ou l'étude d'un métabolisme, mais aussi suffisamment courte pour ne pas entraîner une irradiation excessive du patient. La période physique doit donc être ajustée à la biodistribution du vecteur et à ses propriétés d'élimination. Cette période doit également prendre en compte le délai nécessaire au radiomarquage et à l'acheminement du radionucléide vers le service de médecine nucléaire où il sera utilisé. Pour les éléments à période radioactive très courte (^{11}C : 20,4 minutes, ^{13}N : 10 minutes, ^{15}O : 124 secondes), il est impératif que leur production, la synthèse de la molécule marquée, la mise en forme pharmaceutique, le contrôle de qualité et la dispensation se fassent sur le site même d'utilisation. Les molécules marquées au Fluor 18 (^{18}F -FDG, ^{18}F -FNa, ^{18}F -DOPA), émetteur de positons de période plus longue (109,8 minutes), peuvent être préparées à distance du centre d'utilisation. Ainsi, en TEMP, la période est idéalement de 6 à 8 heures. Pour la TEP, elle est de préférence supérieure à 1 heure. En thérapie, afin de permettre un contact prolongé avec la cible, la période physique des radionucléides utilisés oscille entre 10 heures et 10 jours.

1.5.5.1.2.4. Autres critères

Les radionucléides doivent se caractériser par une radioactivité spécifique élevée (activité rapportée à l'unité de masse), être obtenus les plus purs possible, être facilement disponibles et peu onéreux. Il faut aussi tenir compte des caractéristiques de l'élément formé par décroissance, qui peut être stable ou non, auquel cas, le type de rayonnement émis doit être considéré lors du choix du radionucléide père.

L'activité d'un radionucléide est mesurée en Becquerel (Bq). Cette unité correspond à la désintégration d'un atome par seconde. Il est à noter que le Becquerel remplace le Curie (Ci), qui équivaut à 37 gigabecquerels (GBq).

1.5.5.1.3. Le radiomarquage

Les médicaments radiopharmaceutiques peuvent être constitués de radioéléments seuls sous une forme chimique simple (^{123}I , ^{131}I , ^{201}Tl , $^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$,...). Toutefois, la visualisation d'un organe ou d'une pathologie requiert le plus souvent l'association d'un vecteur au radioélément. Ce vecteur possède un tropisme particulier pour la cible, organe ou fonction de l'organisme. L'ensemble vecteur (trousse) et radioélément (marqueur) correspond au médicament radiopharmaceutique. Le vecteur détermine la biodistribution et permet d'apprécier la fonctionnalité de l'organe cible. Le radionucléide peut être lié au vecteur par fixation covalente, c'est par exemple le cas des halogènes monocoordinés (^{123}I , ^{18}F), qui sont fixés aux ligands par une liaison covalente lors notamment de substitutions nucléophiles ou électrophiles. La fixation peut aussi résulter d'une réaction de complexation, c'est le cas des métaux de transition et post-transition polycordinés ($^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In). Un site de complexation est requis afin de pouvoir établir plusieurs liaisons métal-ligand. Toutefois, certaines molécules sont chimiquement inertes vis-à-vis de radionucléide comme par exemple le technétium, c'est le cas notamment de structures complexes (polypeptides, anticorps monoclonaux). Il est nécessaire, au préalable, de greffer un (ou plusieurs) synthon bifonctionnel capable de se lier à la molécule vectrice biologiquement active et à l'autre extrémité de fixer le radionucléide. La chimie de coordination est susceptible de modifier les propriétés de la molécule biologique, notamment du fait de l'effet stérique. Aussi, afin de préserver l'affinité de la molécule ciblant, il est préférable d'éloigner le motif chélatant. Le linker peut être une chaîne hydrocarbonée augmentant la lipophilie, une séquence d'acides aminés ou un polyéthylène glycol (PEG) pour favoriser l'hydrophilie et orienter vers une

élimination rénale. Enfin, pour de petites molécules présentes dans l'organisme, le marquage peut consister en un échange isotopique direct, c'est à dire le remplacement d'un atome stable par un atome radioactif (^{11}C , ^{15}O , ^{13}N). Le développement de traceurs radiopharmaceutiques s'oriente vers des petits peptides (quelques kiloDaltons). En effet, il s'agit le plus souvent de molécule de structure simple dont la synthèse est bien codifiée avec un marquage aisé. Cette taille réduite permet une clairance sanguine rapide et confère un caractère peu immunogène [85].

Les radioéléments utilisés durant le marquage sont obtenus lors de réactions nucléaires produites, soit dans un réacteur nucléaire, soit dans un accélérateur de particules (cyclotron). Les produits de réacteurs sont formés par fission (^{99}Mo) ou par bombardement neutronique d'une cible (^{131}I , ^{125}I , ^{32}P). Les produits de cyclotron sont pour leur part générés après bombardement par des particules chargées (^{201}Tl). Les principaux émetteurs de positons utilisés (^{11}C , ^{15}O , ^{13}N , ^{18}F) sont produits par un cyclotron. Les radioéléments peuvent aussi être disponibles sous forme de générateur ($^{99}\text{Mo}/^{99\text{m}}\text{Tc}$). Le radionucléide parent est un produit de réacteur ou de cyclotron qui se désintègre en donnant un élément fils de période physique plus courte. C'est ce radionucléide fils qui est ensuite obtenu par élution du générateur au sein du service de médecine nucléaire. Il est à noter que le technétium obtenu sous forme oxydée pertechnétate ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) nécessite une réduction, généralement effectuée par l'ion Sn^{2+} afin de pouvoir se complexer au vecteur.

Les molécules vectrices sont commercialisées sous forme de trousse, c'est à dire un ensemble de réactifs stériles, apyrogènes et pré-conditionnés le plus souvent sous forme de flacons sous azote contenant un lyophilisat.

Les caractéristiques de désintégration des isotopes (β^+ , β^- , γ) imposent l'utilisation au sein de la radiopharmacie de matériels de radioprotection adaptés pour leurs manipulations : enceinte blindée, protège-seringues pour les rayonnements de haute et basse énergie.

Le radiomarquage doit permettre l'obtention d'un radiopharmaceutique le plus pur possible avec un haut rendement et une activité spécifique élevée. Les modalités de préparation doivent être rapides et faciles et dépendent de la capacité d'incorporation du marqueur à la molécule vectrice. D'un point de vue chimique, le vecteur doit permettre une synthèse automatisable et doit être peu sensible aux conditions de marquage. Le marquage doit être stable dans le temps et faire l'objet de contrôles aisés, fiables et reproductibles. Le produit de cette réaction doit se caractériser par une forte affinité et spécificité pour l'organe à

visualiser (diagnostic) ou à atteindre (thérapeutique). La période effective du médicament, c'est à dire, le temps nécessaire pour que la radioactivité dans l'organisme diminue de moitié, doit permettre la réalisation de l'examen scintigraphique. Cette période prend en compte la décroissance physique du radioélément, mais aussi la période biologique correspondant à l'élimination du radiopharmaceutique par l'organisme. Par conséquent, lors d'un examen diagnostique, la période effective doit être suffisante pour permettre l'exploration fonctionnelle, mais également limitée pour réduire au maximum l'exposition de l'organisme. Le traceur doit donc présenter une clairance sanguine, ainsi qu'une diffusion tissulaire et une interaction tumorale rapides. En cas de traitement, la période effective doit être prolongée pour assurer un temps de contact adapté du médicament radiopharmaceutique avec sa cible.

1.5.5.2. L'imagerie isotopique de la néoangiogenèse

1.5.5.2.1. Les ligands de VEGF/VEGFR

Le VEGF présente un taux localement élevé lors d'états pathologiques. Par conséquent, la mesure quantitative de manière non-invasive de ce facteur dans la tumeur et l'environnement tumoral, devrait permettre de prédire les cibles disponibles pour les traitements anti-angiogéniques, et informer quant à leur efficacité. La visualisation de VEGF/VEGFR pourrait intervenir pour de multiples pathologies (infarctus du myocarde, accidents vasculaires cérébraux, tumeurs...) et en particulier dans le suivi et le monitoring des traitements anti-angiogéniques bloquant l'interaction VEGF/VEGFR-2 [86]. Une première stratégie de marquage repose sur l'utilisation d'anticorps anti-VEGF, notamment le bevacizumab, anticorps monoclonal humanisé utilisé dans l'Avastin® (⁸⁹Zr-bevacizumab) [87]. Cette voie de recherche témoigne d'une accumulation tumorale sans fixation non spécifique dans les organes. Toutefois, des problèmes demeurent tels que la distribution, la clairance, l'immunoréactivité de ces anticorps radiomarqués, ainsi que le délai nécessaire pour l'obtention d'images de bon contraste [88].

La seconde option réside dans l'utilisation du VEGF-A et de ses dérivés [89,90]. Le principal avantage de ces composés est qu'ils sont des ligands naturels des VEGFRs et présentent une forte affinité de fixation pour ces récepteurs. L'optimisation de la pharmacocinétique, du fait d'une fixation rénale importante, favorise le développement du marquage de VEGF₁₂₁ et/ou des mutants de cette isoforme, notamment avec du cuivre 64 [91].

1.5.5.2.2. Les ligands de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

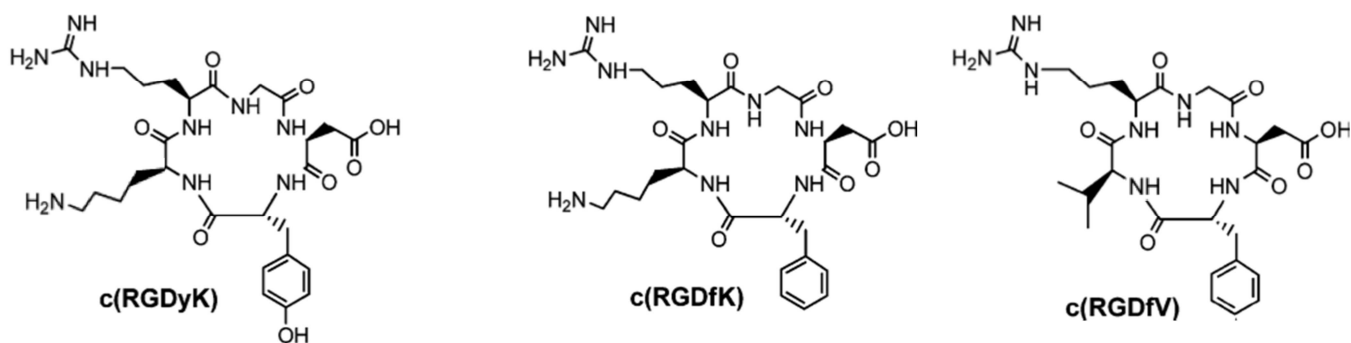


Figure 4 : schéma des principales structures cyclique RGD utilisées pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

Physiologiquement, les intégrines sont peu voire pas exprimées au niveau des cellules épithéliales et des cellules endothéliales matures. Elles caractérisent essentiellement un état pathologique et sont exprimées au niveau des néovaisseaux et des cellules tumorales. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ joue un rôle central dans le développement tumoral. Différentes tumeurs surexpriment cette intégrine parmi lesquelles les ostéosarcomes, les neuroblastomes, les glioblastomes, les mélanomes, les carcinomes du sein, du poumon et de la prostate. Une surexpression de $\alpha_v\beta_3$ semble corrélée avec le potentiel métastatique et l'agressivité tumorale. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ interagit avec les protéines de la matrice extracellulaire par la séquence tripeptidique RGD (**Figure 4**). Kessler *et al* ont donc synthétisé le premier peptide sélectif de $\alpha_v\beta_3$ en se basant sur ce motif : le cyclo(-Arg-Gly-Asp-DPhe-Val-) [92]. Les peptides RGD, les plus prometteurs pour permettre l'identification et la localisation de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sont de petite taille (meilleure affinité), cycliques (peu métabolisés, encore plus affins), avec une phénylalanine dans le cycle contenant la séquence RGD (augmentation de l'affinité).

1.5.5.2.2.1. Les ligands monomériques

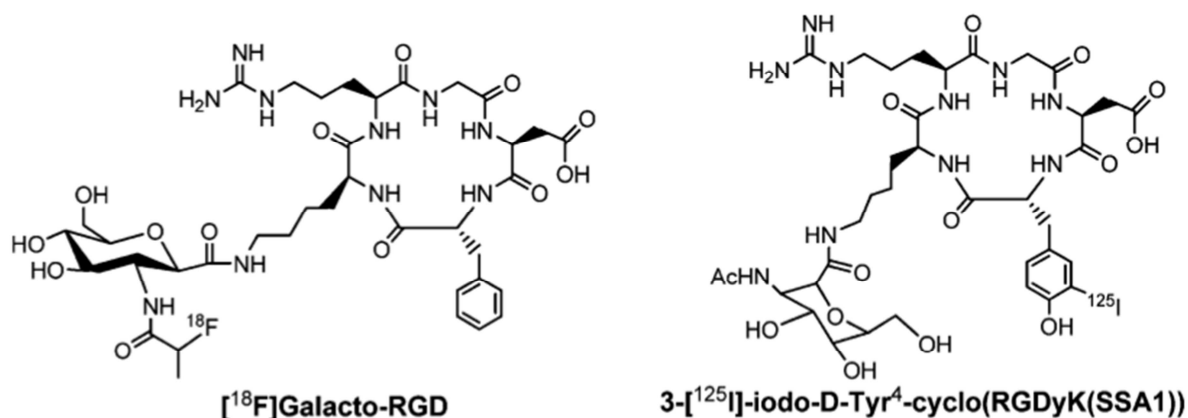


Figure 5 : Principaux exemples de structures carbohydrate conjuguées aux peptides RGD cycliques

Les premiers dérivés explorés sont des monomères de cette séquence RGD. Concernant les halogènes, les premiers dérivés ont été obtenus par radio-iodation électrophile pour l'imagerie TEMP. Le 3-^{*}I-Iodo-DTyr⁴-cyclo(Arg-Gly-Asp-DTyr-Val) et le 3-^{*}I-Iodo-Tyr⁵-cyclo(Arg-Gly-Asp-DPhe-Tyr) ont montré une spécificité correcte pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ *in vitro* et *in vivo* (**Figure 5**), mais la forte fixation hépatique et intestinale, résultant de leur élimination hépatobiliaire, limite leur intérêt [93].

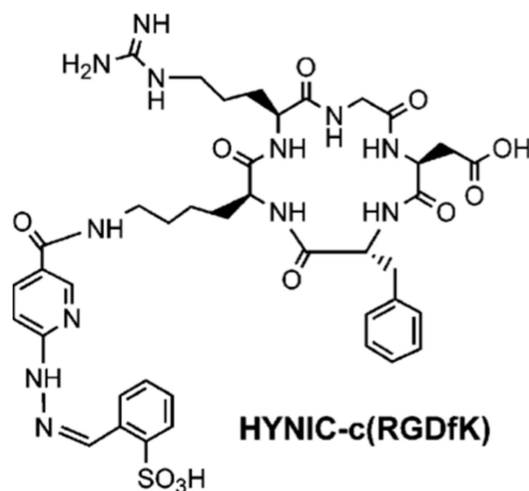


Figure 6 : Schéma représentant la structure HYNIC conjuguée au peptide cyclique c(RGDfK)

Des dérivés technétiés ont également vu le jour, en association avec différents chélateurs bifonctionnels. Le c(RGDyK) (cyclo (-Arg-Gly-Asp-DTyr-Lys-)) a été couplé à de multiples ligands dont l'acide hydrazino-nicotinique (HYNIC) (**Figure 6**) [94,95]. Toutefois, ces peptides montrent une lipophilie importante à l'origine d'une forte fixation hépatique et d'une excrétion hépatobiliaire majoritaire. GE Healthcare a aussi développé un traceur pour la TEMP, le ^{99m}Tc-NC100692, qui a dans un premier temps été évalué chez des patientes atteintes de cancer du sein, chez lesquelles 19 des 22 tumeurs présentes ont pu être retrouvées [96]. D'autres essais ont ensuite été menés chez des patients atteints de cancer pulmonaire ou de cancer du sein [97–100].

Concernant la tomographie par émission de positons, divers radionucléides ont été utilisés, tels que le fluor 18, puis le gallium 68 et le cuivre 64. Quelques-uns de ces radiotraceurs font désormais l'objet d'essais cliniques chez l'Homme, c'est notamment le cas du ¹⁸F-galacto-RGD [101], (du ¹⁸F-FPP-(RGD)₂ [102]), du ¹⁸F-AH111585 (¹⁸F-fluciclatide) [103,104], et du ⁶⁸Ga-NOTA-RGD [105].

Jacobson *et al* se sont intéressés à des peptides marqués au ^{89}Zr , évalués *in vitro* et *in vivo* chez l'animal sur des modèles de cancers du sein MDA-MB-435 [106].

Sur le plan thérapeutique, le ^{177}Lu et l' ^{90}Y ont été couplés à des peptides RGD [107,108].

Afin d'assurer la complexation de ces métaux, différents chélates ont été utilisés : c'est le cas par exemple de l'acide tétra-aza-1,4,7,10-cyclododécane-N,N',N'',N'''-tétraacétique ou DOTA (^{64}Cu -DOTA-RGDyK [109], ^{68}Ga -DOTA-RGDfK, ^{111}In -DOTA-RGDfK [110]). De même, le NOTA, acide-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique et son dérivé l'acide isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacétique (SCN-Bz-NOTA) ont été conjugués au c(RGDyK) [111]. Enfin, le NODAGA, c'est à dire l'acide 1,4,7-triazacyclononane-1-glutarique acide-4,7-diacétique, a été mis au point [5]. Le couplage de ce chélate avec le c(RGDfK), en association avec un marquage au ^{68}Ga , conduit à une activité sanguine considérablement réduite, tout en conservant une bonne spécificité de fixation tumorale.

1.5.5.2.2. Amélioration de la biodisponibilité et de la pharmacocinétique

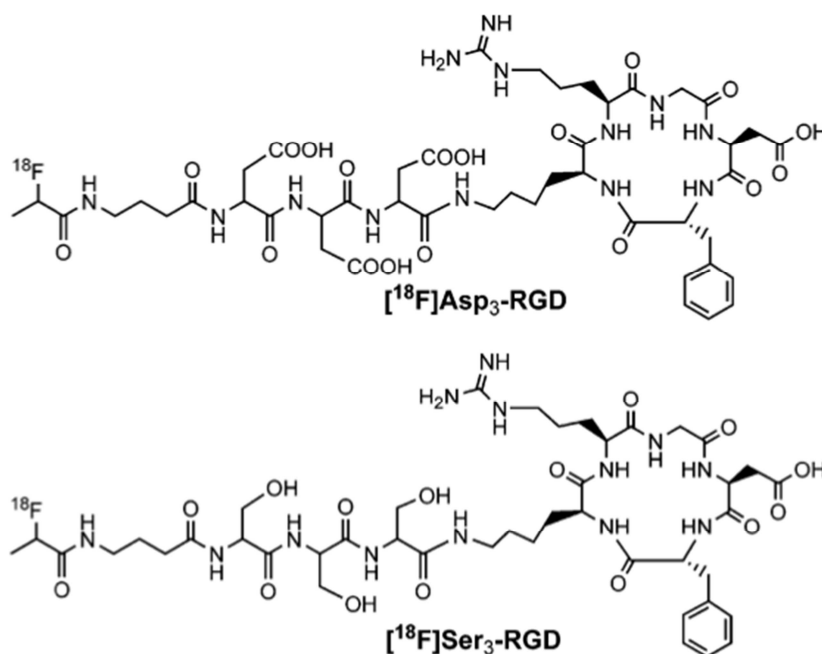


Figure 7 : Schéma des structures couplant acides aminés hydrophiles et séquence RGD

Cette amélioration a pour but de permettre une fixation tumorale rapide et une rétention convenable tout en maintenant une faible fixation et une rapide élimination dans les

autres tissus non ciblés. Pour atteindre ces objectifs, le caractère hydrophile des traceurs doit être augmenté. Afin d'améliorer la pharmacocinétique et notamment d'accélérer la cinétique sanguine, des groupements glucose, galactose ou des chaînes d'acides aminés hydrophiles (tri-sérine, tri-acide aspartique) ont été ajoutés à la structure (**Figure 7**) [112–114]. L'ajout d'une fonction glycosylée sur la base RGD augmente l'élimination rénale et favorise le rapport de fixation tumeur sur bruit de fond. Des résultats comparables sont observables avec les acides aminés hydrophiles. L'ajout d'une chaîne de polyéthylène glycol sur la structure RGD permet aussi une amélioration de la rétention tumorale par internalisation de la molécule [115,116].

1.5.5.2.2.2.1. La glycosylation

Ce procédé fait intervenir des acides aminés sucrés, conjugués par l'intermédiaire de la fonction ε -aminée de la lysine de la séquence pentapeptidique. Un des premiers composés synthétisés fut le ^{123}I -gluco-RGD, suivi assez rapidement par le ^{18}F -galacto-RGD (**Figure 5**). Ce dernier est le plus étudié en TEP, et est considéré comme référence dans l'étude de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il est obtenu par conjugaison de 4-nitrophenyl-2- ^{18}F -fluroropionate [117]. Ce traceur présente une fixation spécifique chez l'animal et chez l'Homme, ainsi que des propriétés pharmacocinétiques satisfaisantes permettant de suivre l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de la quantifier [114,118]. Ses résultats témoignent d'une élimination majoritairement rénale, d'une clairance sanguine rapide, d'un bruit de fond limité, et d'une fixation en adéquation avec l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et aussi avec la densité vasculaire de vaisseaux $\alpha_v\beta_3$ positifs.

Le ^{18}F -galacto-RGD a fait l'objet de diverses études précliniques, plus de 100 patients ont ainsi été injectés avec ce traceur dans le cadre de l'investigation de pathologies telles que les mélanomes malins, les glioblastomes, les cancers ORL, les sarcomes, les cancers pulmonaires non à petites cellules et les cancers de la prostate. La dose nécessaire par patient a été estimée à environ 185 MBq et la dose efficace correspondante est de l'ordre de $18.7 \pm 2.4 \mu\text{Sv/MBq}$ [117,119–121].

1.5.5.2.2.2.2. La pegylation

La pegylation permet d'adapter la pharmacocinétique, la réactivité immunologique, et de prolonger le temps moyen de circulation du peptide en orientant vers un mode d'élimination non plus rénal mais hépatique. Ceci étant bien sûr à relier au poids moléculaire

du PEG, qui peut être adapté en fonction de la longueur de la chaîne sans engendrer de modification de la charge. Différents exemples soulignent l'intérêt d'une telle stratégie. Aussi, les comparaisons respectives des formes pégylées et non pégylées de l' $[^{125}\text{I}]\text{-c(RGDyK)}$ et du $[^{64}\text{Cu}]\text{-DOTA-RGD}$ présentent une moindre fixation rénale, une rétention tumorale accrue et une clairance sanguine accélérée en faveur des composés pégylés [115,116].

De ces deux stratégies d'amélioration des propriétés pharmacocinétiques, glycosylation ou pegylation, quelle est la plus efficace ?

Liu *et al* ont comparé chez l'animal les versions pégylées et glycosylées de peptides RGD. Les ratios de fixation tumeur sur bruit de fond 2 heures p.i. (post-injection) se sont avérés comparables pour les différents traceurs. Seule une synthèse un peu plus aisée favorise le dérivé pégylé [122].

1.5.5.2.2.3. La multimérisation

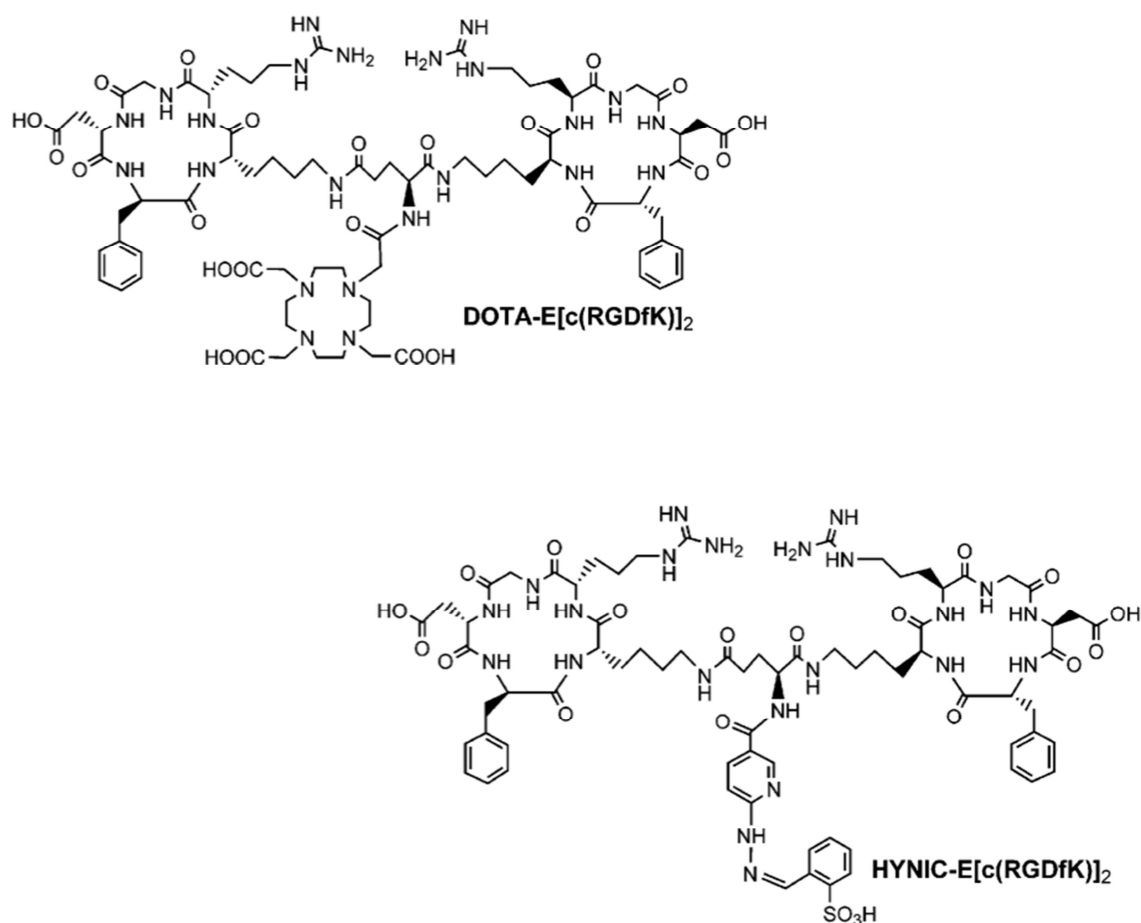


Figure 8 : Schéma des structures dimériques HYNIC et DOTA conjuguées aux peptides RGDfK

Désormais, l'évolution tend vers des molécules multimériques, c'est à dire comprenant plusieurs cycles RGD ou épitopes dans la structure du traceur. Ceci permet une modification de la biodistribution et de la vectorisation de la molécule. Cette technique permet également d'accroître l'affinité et la sélectivité *in vitro*, et de favoriser l'accumulation tumorale *in vivo*. Cette dernière est d'autant plus importante que le nombre de cycles RGD augmente [123]. Cette amélioration est vraisemblablement due à une augmentation de la concentration locale en ligands et à un phénomène de coopération des interactions.

Différents linkers ont été utilisés pour relier les épitopes. Par exemple, des peptides contenant deux c(RGDfK) reliés par un acide glutamique ont été synthétisés et conjugués au DOTA ou à HYNIC lors du radiomarquage (**Figure 8**). La comparaison du ^{99m}Tc -HYNIC-E-[c(RGDfK)]₂ au ^{99m}Tc -HYNIC-c(RGDfK) montre une affinité pour $\alpha_v\beta_3$ dix fois supérieure et une meilleure rétention tumorale pour le composé dimérique, mais aussi une fixation rénale supérieure. Pour les composés DOTA conjugués, la multimérisation permet d'augmenter la stabilité métabolique, la fixation et la rétention tumorales, la clairance sanguine, mais elle augmente aussi la fixation parasite rénale.

Des résultats comparables ont été obtenus pour des multimères reliés par l'intermédiaire de PEG, et mini-PEG ou utilisant notamment RAFT (Regioselectivity Addressable Functionalized Template) comme support de synthèse [11,124]. Il est également possible de parler du ^{99m}Tc - αP2 qui a été testé chez des patients souffrant de mélanome malin [125].

De manière globale, la multimérisation aboutit à une fixation et une rétention tumorale accrues, croissant de pair avec le nombre de cycles RGD au sein de la structure. Elle permet d'analyser et de quantifier l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Toutefois, le ratio de fixation tumeur sur bruit de fond (T/B) n'est pas pour autant meilleur du fait d'une fixation importante au niveau des organes sains. En outre, le prix considérable de ces composés nécessite d'envisager une autre voie que l'augmentation perpétuelle du nombre de cycles RGD au sein de la molécule traceuse.

1.5.5.2.2.2.4. Multimérisation : le cas particulier de la bivalence

L'amélioration de l'affinité de liaison du peptide RGD à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ repose sur deux propriétés différentes, d'une part, la concentration locale en cycles RGD, qui augmente

la probabilité de fixation, et d'autre part, la bivalence. Cette dernière dépend de la distance entre deux cycles RGD adjacents, qui, si elle est suffisante, permet une fixation simultanée des différents cycles sur leurs cibles. Ces deux facteurs, de concentrations et de bivalence, concourent à l'amélioration de la fixation et de la rétention tumorale.

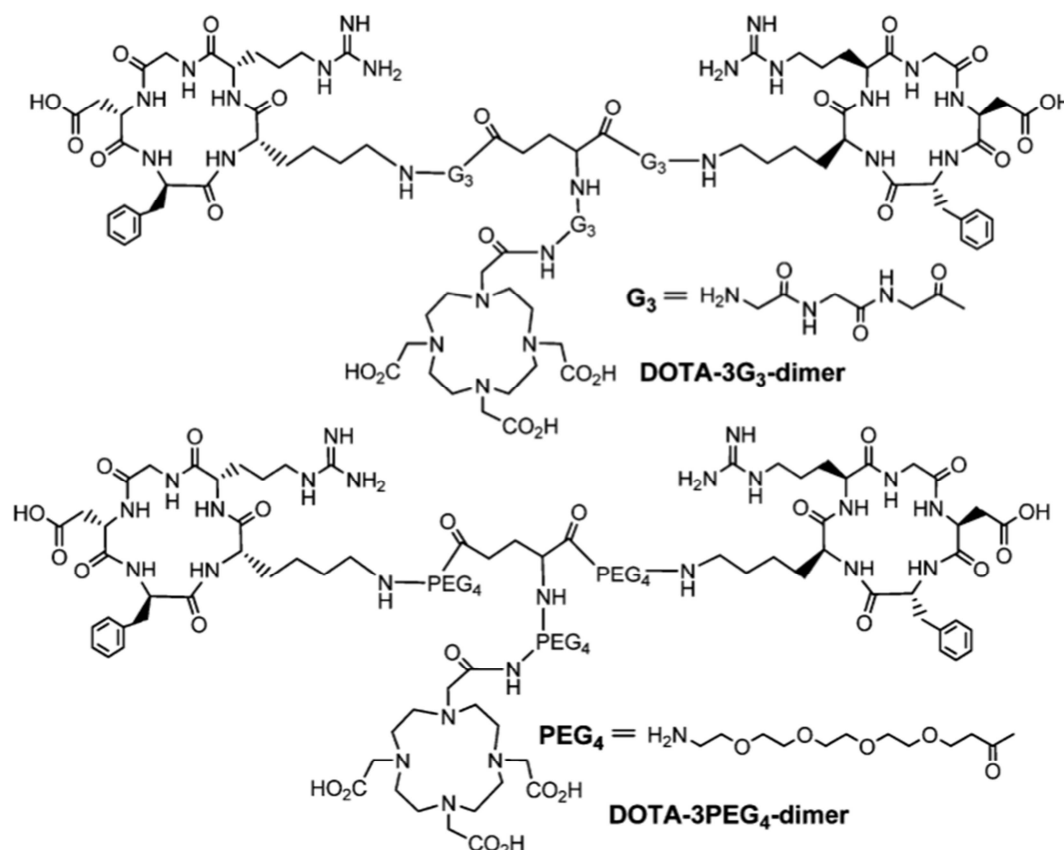


Figure 9 : Schéma des dimères DOTA-3G₃ et DOTA-3PEG₄

Afin de démontrer ces propriétés, des composés dimériques ^{99m}Tc -HYNIC-RGD₂, ^{64}Cu -DOTA-RGD₂, mais aussi ^{111}In -DOTA-RGD₂ et ^{68}Ga -NOTA-P4-RGD₂ espacés par différents substituants PEG ou triglycine (G₃) ont été comparés à des formes sans espaceurs ou à des dérivés tétramériques (**Figure 9**) [126]. Les résultats témoignent d'une augmentation de l'affinité de liaison due à la présence de 3 PEG₄ et G₃ mais qui est similaire à celle des dérivés tétramériques du fait de la présence de deux cycles RGD supplémentaires [127]. L'utilisation de tétramères avec espaceurs n'a pas montré d'amélioration en comparaison avec des dimères possédant eux même des linkers PEG. Ces expériences montrent que les composés tétramériques ainsi testés ne sont pas vraisemblablement tétravalents mais font intervenir le facteur de concentration [128].

Enfin, l'impact de ce facteur de bivalence est fonction de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et donc de sa densité. Si son expression et donc sa densité sont importantes, alors la distance entre deux récepteurs sera réduite. Ceci va permettre à des formes de peptides multimériques de faire intervenir plus facilement le facteur de bivalence. *A contrario*, plus l'expression de l'intégrine est limitée plus la distance entre deux cycles sera importante et plus la présence d'espaceurs de longueur appropriée entre les cycles RGD sera nécessaire.

1.5.5.2.3. Amélioration de l'étape de radiomarquage

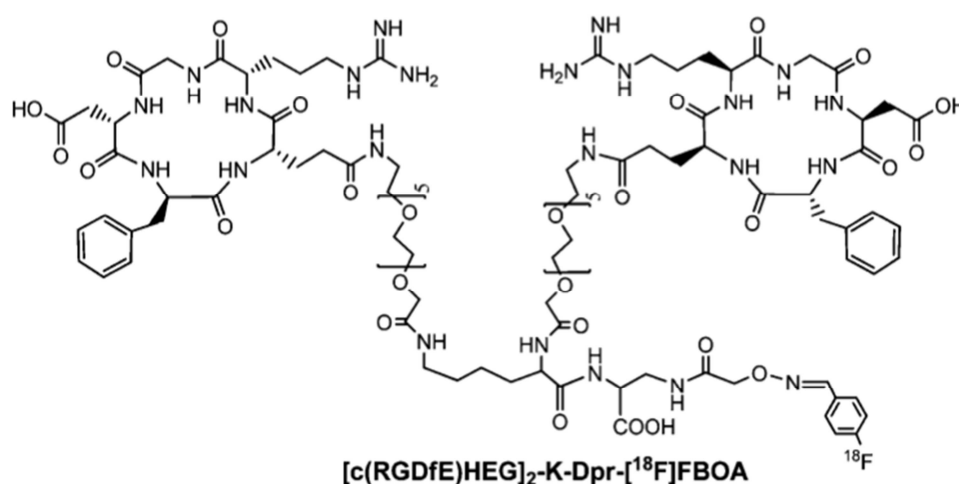


Figure 10 : Schéma du dimère contenant la structure N-(4-¹⁸F-fluorobenzylidene)oxime (FBOA)

La synthèse du ¹⁸F-galacto-RGD, nécessite l'utilisation d'esters activés et requiert des stratégies de synthèse longues et complexes. Un précurseur glycosidique a été utilisé pour permettre une meilleure combinaison du marquage au fluor 18. L'utilisation de ce groupement prosthétique carbohydrate permet l'obtention d'un rendement radiochimique de plus de 30 % et d'une pureté radiochimique supérieure à 98 %, mais pour un temps de synthèse totale de 200 minutes.

Pour améliorer ces paramètres, des marquages sélectifs sont étudiés en se basant sur la formation d'oxime, c'est le cas par exemple avec l'utilisation du 4-¹⁸F-fluorobenzaldéhyde [129,130], du ¹⁸F-fluorosilylbenzaldehyde [131], et du ¹⁸F-FBOA-E[c(RGDfE)]₂ (**Figure 10**). De plus, la formation d'oxime chimiosélectif est aussi envisagée pour assurer la conjugaison du ¹⁸F-FDG à un peptide RGD amino-oxy fonctionnalisé. En permettant l'incorporation d'une telle stratégie au sein d'un système automatisé, cela pourrait conduire à une méthode de choix dans l'obtention de peptides glycosylés marqués au fluor 18 avec un haut rendement de synthèse. La difficulté réside dans l'élimination du glucose non marqué, qui est un

compétiteur de la réaction de conjugaison. D'autres stratégies utilisant la réactivité du groupement thiol ont permis l'obtention de monomères ou dimères RGD avec un important rendement radiochimique et une haute activité spécifique. Elles peuvent faire intervenir des groupements réactifs thiol donneur de groupement glycosyl [132], ou des synthons réactifs thiol, comme pour le *N*-[2-(4-¹⁸F-fluorobenzamido)ethyl]maléimide (¹⁸F-FBEM) [133].

La cyclo-addition [3+2] azoture-alcyne catalysée au Cu de Huisgen ou « chimie click » a été envisagée comme alternative à la technique de condensation d'amino-oxy aldéhyde. Elle se caractérise par des conditions de réactions douces, une bonne faisabilité et sélectivité, pour un temps de réaction relativement court [134]. Aussi, le ¹⁸F-RGD-K5, traceur peptidomimétique, présentant une haute affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, fait désormais l'objet d'essais cliniques dont les premiers résultats sont encourageants [135]. Deux principaux types de groupements prosthétiques sont retrouvés en chimie click, les organoazotures et alcynes. Avec cette approche, des temps de radiosynthèse de l'ordre de 70 minutes sont possibles, avec un rendement radiochimique de 35 %. Afin d'associer amélioration des propriétés pharmacocinétiques et optimisation du radiomarquage, une technique combinée couplant chimie click et introduction de sucres a été développée, notamment avec le ¹⁸F-Maltose-RGD [136]. Le traceur, ¹⁸F-TCO-tétrazine-RGD, a quant à lui, été obtenu par une cyclo-addition de type Diels-Alder, avec le tétrazine-*trans*-cyclooctène de façon rapide, efficace et à faible concentration [137,138].

Les techniques d'échange isotopique ont aussi été explorées. La méthode SiFA a par exemple été utilisée pour le marquage au fluor 18 du *p*-(di-*tert*-butylfluorosilyl) benzaldéhyde *via* la formation d'oxime. Le recours à des composés borés a également été envisagé avec l'obtention de ¹⁸F-aryltrifluoroborate-RGD [139].

Liu *et al* se sont intéressés à la réaction entre Al¹⁸F et un chélateur macrocyclique conjugué à un dimère RGD. L'objectif est ici de remplacer l'introduction du fluor par la formation d'une liaison covalente *via* l'utilisation de la chimie de coordination au moyen de la complexation de AlF préalablement formé. La fluoration a alors été réalisée en 40 minutes. Le ¹⁸F-Alfatide repose sur la complexation du fluorure d'aluminium avec le NOTA et fait d'ores-et-déjà l'objet d'essais cliniques [140–145]. L'optimisation des techniques de marquage et de purification aboutit à un temps de radiosynthèse d'environ 30 minutes.

Enfin, pour optimiser cette étape, une autre stratégie a reposé sur l'utilisation de gallium 68. Des conjugués DOTA puis NOTA et NODAGA ont vu le jour [110,111,146,147].

Haubner *et al* ont synthétisé des pentapeptides cycliques c(RGDfK) marqués au ^{64}Cu et ^{68}Ga en utilisant les chélateurs NODAGA et CB-TE2A (4,11-bis(carboxyméthyl)-1,4,8,11-tétraazabicyclo[6.6.2]hexadécane). L'objectif a été de simplifier la procédure de marquage avec le gallium et de permettre une imagerie tardive avec le cuivre pour obtenir un meilleur ratio de fixation tumeur sur bruit de fond. Le NODAGA-c(RGDfK) a ainsi été marqué au gallium en 10 minutes à température ambiante. Quant au ^{64}Cu -NODAGA-c(RGDfK) et au ^{64}Cu -CB-TE2A-c(RGDfK), ils présentent à 18 heures p.i. un ratio de fixation tumeur sur organes 20 fois plus important. De nouveaux chélateurs sont développés. Le ^{64}Cu -AmBaSar-RGD₂, obtenu avec des conditions douces de marquage en 30 minutes témoigne de résultats précliniques et de stabilité satisfaisants [148,149]. Le ^{64}Cu -BaBaSar-RGD₂ est désormais en cours d'étude [150]. Ces résultats soulignent l'intérêt du cuivre et du gallium comme alternatives au fluor pour le marquage de peptides RGD, avec l'essor de nouveaux chélates pour faciliter et optimiser leurs marquages [147,151,152]. Plus récemment, de nouvelles alternatives ont été développées avec les conjugués H₂dedpa et le TRAP(RGD)₃ [153,154]. Le chélateur TRAP est proche du NOTA avec toutefois le remplacement d'acides carboxyliques par des acides phosphoniques. Il possède d'une part, une forte affinité pour le gallium, et d'autre part permet la conjugaison directe de 3 peptides par chélatant. Le ^{68}Ga -NOPO-RGD découle de cette famille de chélates [155]. Ce nouveau chélate conduit à un radiomarquage rapide, stable et de haute activité spécifique, mais uniquement de composé monomérique (**Annexe 1**).

1.5.5.2.3. Les ligands de la fibronectine

La fibronectine présente différentes isoformes (III Connecting Segment : III CS, Extra Domain A : ED-A, Extra Domain B : ED-B), impliquées dans de multiples phénomènes tels que la migration cellulaire, la guérison de blessures, et la transformation oncogénique. L'isoforme de la fibronectine contenant le domaine ED-B est surexprimée dans le tissu fœtal et le tissu néoplasique ainsi que lors de la prolifération vasculaire, tandis que sa distribution est habituellement limitée dans les tissus adultes normaux.

La visualisation de l'isoforme ED-B fait intervenir des structures dérivées d'anticorps [112,156]. Cet axe de recherche s'avère avancé puisqu'une forme dimérisée L19(scFv)₂ a été injectée de manière concluante à des patients atteints de cancer du sein, de cancer pulmonaire ou colorectal [157]. Pour l'imagerie TEP, divers études ont souligné la nécessité de

l'utilisation de radio-isotopes de période longue, par exemple l'iode 124 ($T = 4,18$ j) plus en adéquation avec les contraintes de clairance des traceurs [158–161].

1.5.5.2.4. Les inhibiteurs de métalloprotéases : MMP inhibiteurs

La famille des métalloprotéases est divisée en 5 classes, incluant les collagénases, gelatinases, stromolysines, membrane type (MT)-MMP, et les MMP non classées [56]. Les gelatinases MMP-2 et MMP-9 ont été détectées en quantité importante dans les tissus malins et leur surexpression caractérise l'agressivité tumorale et le potentiel métastatique [162]. Différents substrats ont été utilisés afin de constituer des traceurs théoriquement spécifiques d'un type de MMP donné, en se basant sur la spécificité de reconnaissance entre un substrat et son enzyme capable de le cliver après reconnaissance. Le [cyanine fluorochrome]-Gly-Pro-Leu-Gly~Val-Arg—Gly-Lys (FITC)-Cys.NH₂, le PB-M7VIS (PB : Proteolytic Beacon), et PB-M2VIS ont été designés en vue de cibler MMP-2 pour les deux premiers traceurs et MMP-7 dans le proche infra-rouge [163,164].

Le ciblage de ces métalloprotéases en médecine nucléaire repose sur l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques [165]. Différentes stratégies de marquage ont été envisagées, impliquant par exemple le ⁶⁴Cu, et le ¹⁸F [112,166,167]. Le ⁶⁴Cu-DOTA-CTTHWGTLTLC (ou CTT) présente une affinité pour MMP-2 et MMP-9, quant aux dérivés du CGS27023A, marqués au ¹¹C ou ¹⁸F, inhibiteurs de MMP produits par Novartis, ils présentent une affinité pour MMP-1. Mais, en dépit d'une pharmacocinétique et d'une stabilité métabolique correctes, l'accumulation dans le tissu tumoral reste lente et limitée [168,169]. Les traceurs ¹¹C-MSMA, ¹¹C-CGS25966, et ¹¹C-FMAME, ont également fait l'objet d'études précliniques mais ont également donné des résultats décevants.

Parmi les autres pistes étudiées, il est possible de citer l'¹¹¹In-DTPA-RP782, le ^{99m}Tc-(HYNIC-RP805)(tricine)(TPPTS), le Marimastat-ArB[¹⁸F]F₃, le ¹⁸F-SAVO3, l'¹²³I-HO-CGS 27023A. Néanmoins, seul l'¹¹¹In-DTPA-N-TIMP-2 a été injecté à des patients atteints de sarcome de Kaposi [170,171].

Les inhibiteurs de MMP ont été marqués pour l'imagerie TEP ou TEMP mais ils ont aussi été associés au Cy5.5 pour l'imagerie par fluorescence dans le proche infra-rouge, ou couplés à des agents de contraste tels que le gadolinium *via* un DOTA pour l'IRM [172].

D'autres pistes ont été évoquées afin de fournir des informations sur l'angiogenèse tumorale. C'est le cas de la visualisation de la stabilisation de l'endothélium vasculaire par imagerie moléculaire ciblant l'angiopoïétine-1 (intervenant pour la stabilisation) ou l'angiopoïétine-2 (intervenant dans le processus de déstabilisation). L'imagerie de l'apoptose des cellules endothéliales a aussi été explorée, en ciblant des marqueurs spécifiques de l'apoptose tels que l'annexine V pour visualiser l'action de traitements anti-angiogéniques et anti-tumoraux. Enfin, le ^{18}F -FMISO (fluoromisonidazole) utilisé pour quantifier l'hypoxie, notamment sur des cas de gliomes, peut s'avérer intéressant pour évaluer l'effet de thérapie anti-angiogénique.

2. Les modèles tumoraux étudiés

Parmi les pathologies malignes potentiellement concernées, notre étude cible les mélanomes malins, mais aussi les gliomes malins de l'adulte et de l'enfant. Il s'agit de tumeurs dont la croissance et la dissémination métastatique sont hautement dépendantes de la néoangiogenèse. Ces pathologies constituent donc un support de choix pour l'étude des traceurs ciblant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la MMP-9, d'autant plus que les traitements novateurs anti-angiogéniques sont envisagés dans leur prise en charge thérapeutique.

2.1. Le gliome

2.1.1. Caractères généraux et épidémiologie

Chez l'adulte, les tumeurs cérébrales malignes représentent 1 à 2 % de l'ensemble des cancers et l'incidence des tumeurs intracrâniennes primitives est de l'ordre de 10/100000 habitants par an. Environ 40 % des tumeurs primitives intracrâniennes sont des méningiomes, 30 % des gliomes et 10 % des adénomes hypophysaires.

Chez l'enfant, les tumeurs du système nerveux central les plus fréquentes sont des tumeurs solides, représentant 20 % des cancers, juste derrière les leucémies (30 % des cancers). Les tumeurs les plus fréquemment rencontrées à l'étage sus-tentorial sont les gliomes et les crâniopharyngiomes [173].

Les gliomes se caractérisent par une infiltration progressive du parenchyme cérébral, à l'origine d'un effet de masse et de perte neuronale. La classification actuelle considère selon l'origine cellulaire de la prolifération, les astrocytomes (ou gliomes), les oligodendrogliomes et les tumeurs mixtes (oligoastrocytomes). La classification anatomopathologique des gliomes chez l'enfant décrit comme chez l'adulte 4 grades de malignité croissante. On distingue les gliomes de bas grade dont les tumeurs astrocytaires (astrocytomes de grade I et II OMS, Organisation Mondiale de la Santé), les oligodendrogliomes (grade II OMS) et les oligoastrocytomes (grade II OMS). Les gliomes de haut grade comprennent parmi les tumeurs astrocytaires : les astrocytomes anaplasiques (grade III OMS) et les glioblastomes (grade IV OMS), ainsi que les oligodendrogliomes anaplasiques (grade III OMS) et les oligoastrocytomes anaplasiques (grade III OMS).

Astrocytomes anaplasiques et glioblastomes multiformes sont les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes chez l'adulte. Les glioblastomes sont quatre fois plus fréquents que les astrocytomes anaplasiques et représentent environ 25 % des tumeurs cérébrales primitives de l'adulte. Le mécanisme tumorigène des gliomes repose sur une accumulation d'anomalies génétiques impliquant des gènes suppresseurs de tumeur, par exemple p53, ou des proto-oncogènes avec la modification de l'expression de gènes codant pour des facteurs de croissance et leurs récepteurs, impliqués dans la prolifération cellulaire (PDGF, EGFR..). Chez l'enfant, certaines particularités de l'oncogenèse ont pu être mises en évidence telles qu'une moindre implication de l'amplification du gène de l'EGFR ou au contraire une surexpression plus fréquente des PDGFR α et β [174].

2.1.2. Principes généraux du traitement

La prise en charge thérapeutique des tumeurs pédiatriques est similaire à celle des pathologies adultes et repose sur l'association de la radiothérapie et d'une chimiothérapie à une chirurgie d'exérèse aussi complète que possible. La chimiothérapie peut faire intervenir le BCNU (carmustine ou Bis-ChloroethylNitrosoUrea) le témozolomide (Temodal[®], MSD, protocole Stupp), le protocole PCV (combinaison de CCNU (lomustine ou 1-(2-chloroethyl)-3-cyclohexyl-nitrosourea), procarbazine et vincristine administrée en cycles de 6 semaines) et des implants de carmustine (Gliadel[®], MGI Pharma). Les résultats du traitement demeurent néanmoins très décevants avec chez l'adulte une médiane de survie ne dépassant guère 3 ans pour les astrocytomes anaplasiques et 1 an pour les glioblastomes. Pour les enfants, le

pronostic est également très sombre, surtout pour les formes du tronc cérébral, avec un taux de survie sans récurrence à 5 ans, de l'ordre de 15 % [175]. Par conséquent, les nouveaux traitements anti-tumoraux (thérapie génique, immunothérapie, chimiothérapie interstitielle ou intra-artérielle, agents anti-angiogéniques, agents différenciants...) font l'objet d'expérimentations précliniques et cliniques. L'essor de thérapies innovantes ciblant les voies de la signalisation cellulaire et de l'oncogénèse constitue un intérêt majeur pour l'amélioration de la prise en charge thérapeutique de ces gliomes de haut grade. En effet, la croissance et la survie des gliomes de haut grade sont hautement dépendantes d'une néoangiogenèse [176], cible actuelle de traitements novateurs anti-angiogènes [177]. Le bevacizumab a permis une amélioration de la survie sans progression avec une tolérance acceptable [178]. L'autorisation de mise sur le marché (AMM) de ce médicament a été modifiée par la FDA aux Etats-Unis mais pas par l'Agence Européenne du Médicament en raison d'un manque de preuve directe d'augmentation de la survie globale. Les études sont en cours en pédiatrie.

2.2. Le mélanome

2.2.1. Caractères généraux et épidémiologie

Le mélanome affecte tous les âges mais reste exceptionnel chez l'enfant avant la puberté. De grandes différences d'incidence sont observées en fonction de la latitude (exposition au soleil) et des caractéristiques ethniques des populations. Cette incidence est considérable chez les Blancs en Australie (40 nouveaux cas/100000 habitants/an) alors qu'elle est très faible dans les pays où les gens sont Noirs ou Jaunes. En France, comme dans de nombreux pays industrialisés, l'incidence double environ tous les 10 ans. On l'estime actuellement à 5-10 nouveaux cas/100000 habitants/an. La mortalité (1,2 à 1,5/100000 habitants en France et autour de 5 en Australie) tend à augmenter mais de manière moindre que l'incidence, du fait peut-être d'un diagnostic plus précoce.

Les principaux facteurs de risque de mélanome sont les antécédents familiaux, les antécédents personnels (risque de second mélanome de 5 à 8 %), la couleur claire de la peau et des cheveux (roux avec des éphélides, blond vénitien), un nombre élevé de nævus, le « syndrome du nævus atypique » et enfin, les antécédents d'expositions solaires intenses avec coups de soleil.

La majorité des mélanomes surviennent *de novo*, en peau apparemment saine sans précurseur. Le risque de transformation maligne des nævus « communs » est très faible. Quant aux nævus congénitaux de grande taille (plus de 20 cm), le risque de transformation est élevé. Toutefois, ces derniers sont exceptionnels et n'occasionnent la survenue que d'un nombre restreint de mélanomes.

2.2.2. La classification anatomo-clinique

Sur le plan anatomo-clinique, on distingue 4 principaux types de mélanomes :

- Le mélanome à extension superficielle (Superficial Spreading Melanoma, SSM) : forme la plus fréquente (60 à 70 % des cas), concernant surtout l'adulte jeune. Le siège est essentiellement situé chez la femme au niveau des jambes, chez l'homme au niveau du tronc, et se développe le plus souvent à partir d'un nævus préexistant. Son développement est intra-épidermique horizontale, puis verticale dermique.
- Le mélanome de Dubreuilh (Lentigo Maligna Melanoma, LMM) : correspondant à 10 % des mélanomes malins, cette tumeur concerne surtout la femme âgée. Elle se localise essentiellement au niveau du visage et est d'évolution lente.
- Le mélanome acral lentigineux (Acral Lentiginous Melanoma, ALM) : cette tumeur concerne l'homme de 50-60 ans. Elle se situe au niveau des extrémités (paumes, plantes, bords latéraux des doigts et orteils et sous les ongles) et est d'évolution lente.
- Le mélanome malin nodulaire (Nodular Melanoma, MN): représentant 15 à 20 % des mélanomes malins. Cette forme, particulièrement péjorative, se caractérise par une prolifération dermique, un très mauvais pronostic et un risque élevé de métastases précoces.

2.2.3. Les principes généraux du traitement

La classification la plus récente des mélanomes se base sur les caractéristiques du mélanome primitif, du statut du ganglion sentinelle et du statut métastatique [179]. Les résultats histologiques du mélanome primitif, cliniques et d'imagerie du bilan d'extension, permettent de connaître le stade précis du patient et ainsi de proposer le traitement le mieux adapté. Les facteurs pronostiques sont surtout histologiques, il s'agit de l'épaisseur tumorale (indice de Breslow), de l'ulcération, de l'index mitotique, et du niveau anatomique d'invasion

dans le derme et l'hypoderme (niveau de Clark). La recherche de micrométastases infracliniques du premier ganglion-relais (ganglion sentinelle) est un marqueur pronostique indépendant de grande valeur. L'examen scintigraphique à base de nanocolloïdes technétiés occupe une place importante dans l'identification de ces ganglions. Ces paramètres, indice de Breslow, envahissement du ganglion sentinelle, ulcération, index mitotique sont les indicateurs pronostiques les plus fiables au stade clinique de tumeur primitive isolée. Ils sont pris en compte au sein de la classification en stades du mélanome et conditionnent l'attitude thérapeutique.

Le mélanome malin présente un très fort potentiel métastatique, puisque quelques millimètres cube de tumeur peuvent entraîner une dissémination métastatique diffuse rapidement létale. L'objectif du traitement est la guérison par l'éradication chirurgicale de la lésion avant la dissémination [180]. La chirurgie reste ainsi le seul traitement permettant la guérison des patients [181,182]. Le traitement de la tumeur primitive consiste donc en une exérèse chirurgicale jusqu'au fascia. Les traitements adjuvants systémiques à base de fotemustine (en cas de métastase cérébrale), dacarbazine peuvent être proposés dans le cas de mélanomes avec atteinte cutanée ou ganglionnaire non résécable ou métastatique viscérale. En cas d'atteinte ganglionnaire (stade III), le temozolomide (hors AMM) (Temodal[®], MSD), le curage ganglionnaire est le traitement standard [179]. Le traitement des mélanomes cutanés métastatiques non résécables (stades IIIC, IV) hors métastase cérébrale est de plus en plus conditionné par l'émergence de thérapies ciblées (inhibiteurs de BRAF, MEK et de KIT). Tout mélanome cutané métastatique doit donc aujourd'hui bénéficier d'un génotypage pour recherche mutationnelle. Les thérapies innovantes font actuellement l'objet d'essais cliniques. Une revue des thérapeutiques ciblées dans le domaine du mélanome malin (inhibiteurs des protéines kinases, immunothérapie, traitements pro-apoptotiques, inhibiteur de métalloprotéases, traitements anti-angiogéniques...) a été publiée montrant des résultats encourageants [183]. Chez les patients présentant une mutation de *BRAF*, le vemurafenib (Zelboraf[®], Roche) entraîne des réponses thérapeutiques majeures qui surviennent chez plus de la moitié des patients traités. Des anticorps, avec l'ipilimumab (Yervoy[®], BMS) et le nivolumab (Opdivo[®], BMS) sont utilisables indépendamment du statut mutationnel et agissent respectivement sur CTLA-4 et PD-1. Toutefois, la mutation *BRAF* V600 n'est présente que chez la moitié des patients, et l'efficacité des anti-BRAF tend à s'atténuer avec le temps, en raison de l'apparition de résistances complexes. Quant à l'immunothérapie, l'ipilimumab, par exemple, ne donne des résultats satisfaisants que chez 15-20 % des patients

traités. Il reste également à optimiser les stratégies thérapeutiques afin de limiter au maximum la survenue d'effets indésirables [184].

La prise en charge thérapeutique de la maladie métastatique, pose la question de l'exérèse chirurgicale des métastases. La radiothérapie et la chimiothérapie sont envisagées, ainsi que la destruction de métastases par radiofréquence, la cryochirurgie des métastases hépatiques, et la perfusion de membre isolé (melphalan, chimiohyperthermie intravasculaire par isolement du membre) [179]. Compte tenu de l'implication de la néoangiogenèse dans le processus métastatique du mélanome malin, la cible anti-angiogénique apparaît une piste de choix dans l'arsenal thérapeutique.

PARTIE 1

Mise au point des techniques d'analyse et évaluation du ^{99m}Tc -bis-c(RGDfK)

Article 1 : “ ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) a potential $\alpha(v)\beta3$ integrin based homobivalent radioligand for imaging neoangiogenesis in malignant glioma and melanoma”

RSC Advances, 2015, **5**, 60161 - 60171

Frédéric Debordeaux, Jürgen Schulz, Catherine Savona- Baron, Anil Kumar Mishra, Colette Ries, Nicole Barthe, Béatrice Vergier, Philippe Fernandez

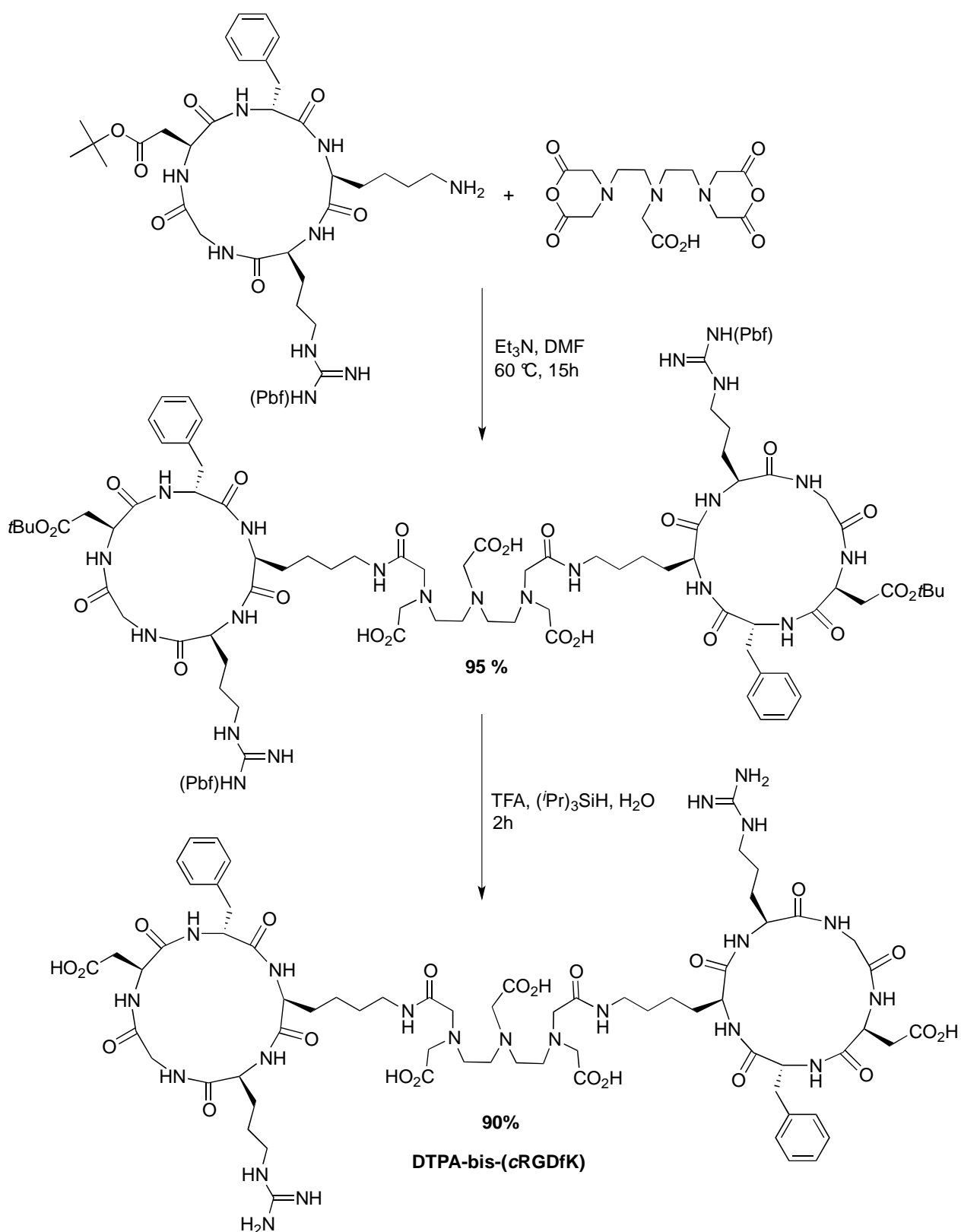


Figure 11 : Schéma de synthèse du précurseur DTPA-bis-c(RGDfK)

L'objectif de ce travail est de caractériser de nouveaux traceurs de la néoangiogenèse. La visualisation de ce processus repose sur le ciblage de certains de ses acteurs principaux : l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et la MMP-9. Ce projet requiert l'utilisation de modèles tumoraux pour lesquels la néoangiogenèse est cruciale tant pour le développement que pour la dissémination métastatique. Les mélanomes malins et les gliomes malins ont ainsi été sélectionnés.

Le développement du traceur technétié, le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), a permis de mettre au point les techniques *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. La validation de ces processus s'est appuyée sur ce traceur pour des raisons, notamment, de disponibilité du radionucléide et de radioprotection. Au-delà de son utilisation pour la définition de nos protocoles, ce traceur constitue une alternative également intéressante pour l'imagerie de la néoangiogenèse, du fait de l'amélioration de la résolution en TEMP.

1. Synthèse et purification du DTPA-bis-c(RGDfK)

La forme linéaire du peptide (RGDfK) est obtenue par une synthèse en phase solide à l'aide d'un synthétiseur de peptide à micro-ondes Liberty 1 (CEM), en utilisant une résine de chlorure de trityle (TCP resin, Sigma-Aldrich) et en appliquant la stratégie Fmoc (9-fluorenylmethyloxycarbonyl) [93,185]. Le groupement protecteur final Fmoc est retiré à l'aide d'une solution de pipéridine à 20 % dans du diméthylformamide (DMF). Les étapes suivantes, c'est-à-dire, le clivage du peptide de la résine, sa cyclisation et l'élimination du groupement protecteur Z, sont effectuées selon le mode opératoire décrit par Haubner *et al.* [93].

La synthèse du DTPA-bis-c(RGDfK) a été réalisée au sein de notre laboratoire et s'inspire du procédé défini par Hazari *et al.* (**Figure 11**) [186,187]. Le bis-anhydride de DTPA (9 mg, 25 μmol , Sigma-Aldrich) et le peptide protégé c(RGDfK) (46 mg, 50 μmol) sont dissous dans 20 mL de DMF anhydre. De la triéthylamine (28 μL , 0,2 mmol, Sigma-Aldrich) est ensuite ajoutée, et la réaction se déroule durant 15 heures à 60 °C. Les solvants sont éliminés par évaporation sous pression réduite, et le conjugué est précipité avec de l'éther diéthylique. La déprotection de l'adduit, concernant le Pbf (2,2,4,6,7-pentaméthyl-dihydrobenzofuran-5-sulfonyl) et les groupements *tert*-butyle, est obtenue par un traitement dans 20 mL de TFA/(iPr)₃SiH/H₂O (92/4/4) à température ambiante pendant 2

heures. Le conjugué DTPA-bis-c(RGDfK) (33 mg, 21 μmol) est enfin précipité, puis lavé à l'éther diéthylique.

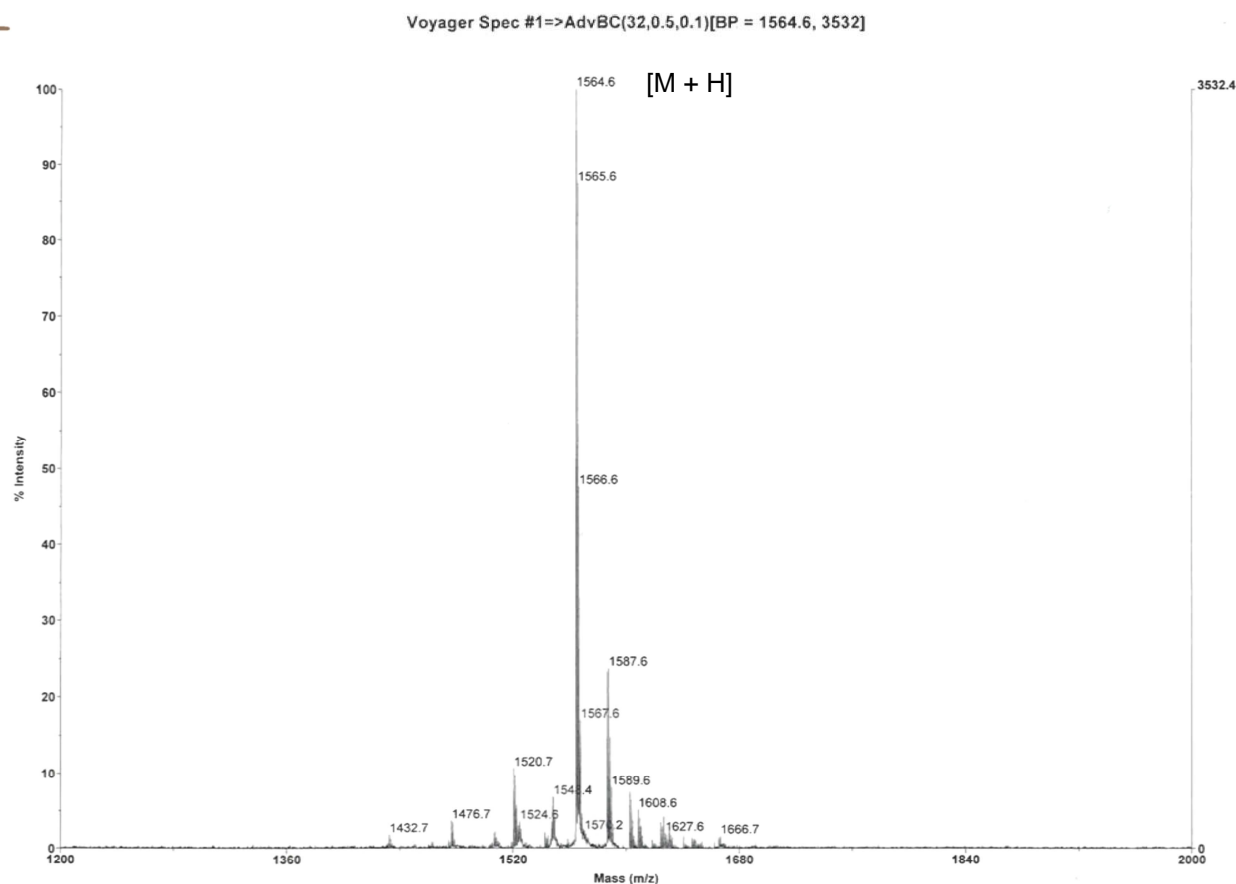
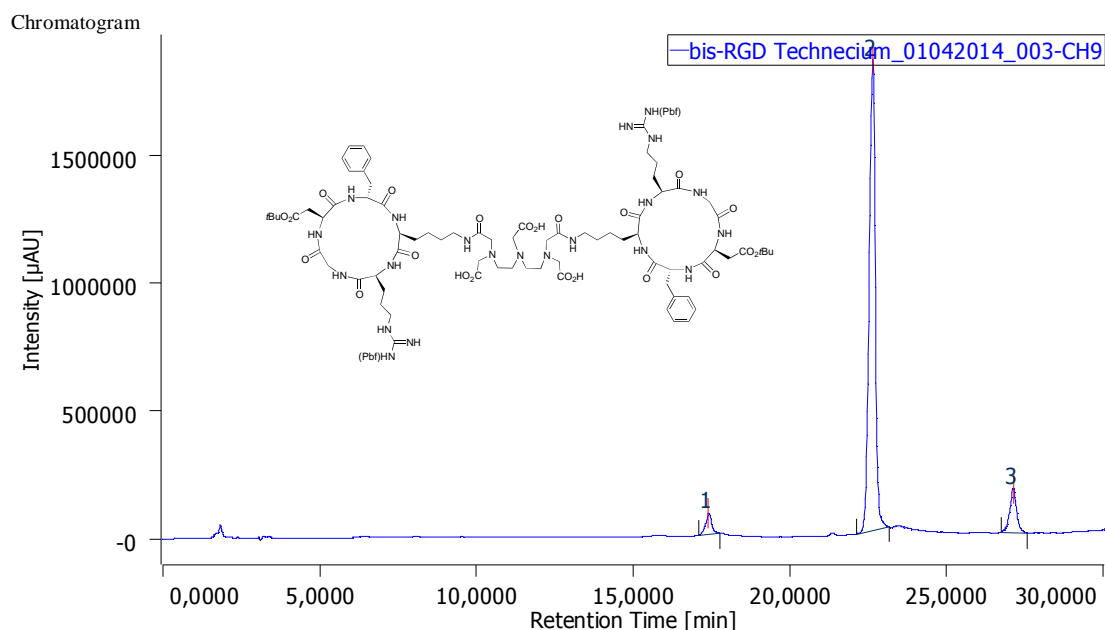


Figure 12 : Spectrométrie de masse en MALDI-TOF du DTPA-bis-c(RGDfK)

Lors des différentes étapes conduisant à la production du ligand froid, les dérivés intermédiaires sont notamment évalués par RMN (Résonnance Magnétique Nucléaire) ^1H , ^{13}C et/ou ^{29}Si , ainsi que par spectrométrie de masse effectuée en MALDI-TOF (Matrix-Assisted-Laser Desorption Ionization-Time Of Flight, spectromètre de masse couplant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol). Cette spectrométrie de masse MALDI-TOF est effectuée sur un spectromètre de masse Voyager (Applied Biosystems) équipé d'un laser pulsé à azote (N_2) (337 nm) et d'une extraction retardée (MALDI-TOF-MS: $[\text{M} + \text{H}]^+ = 1564,6$ (1564,8 Da calculé pour $\text{C}_{68}\text{H}_{102}\text{N}_{21}\text{O}_{22}$)) (**Figure 12**).



Channel & Peak Info.Table

Chromatogram Name bis-RGD Technecium_01042014_003-CH9

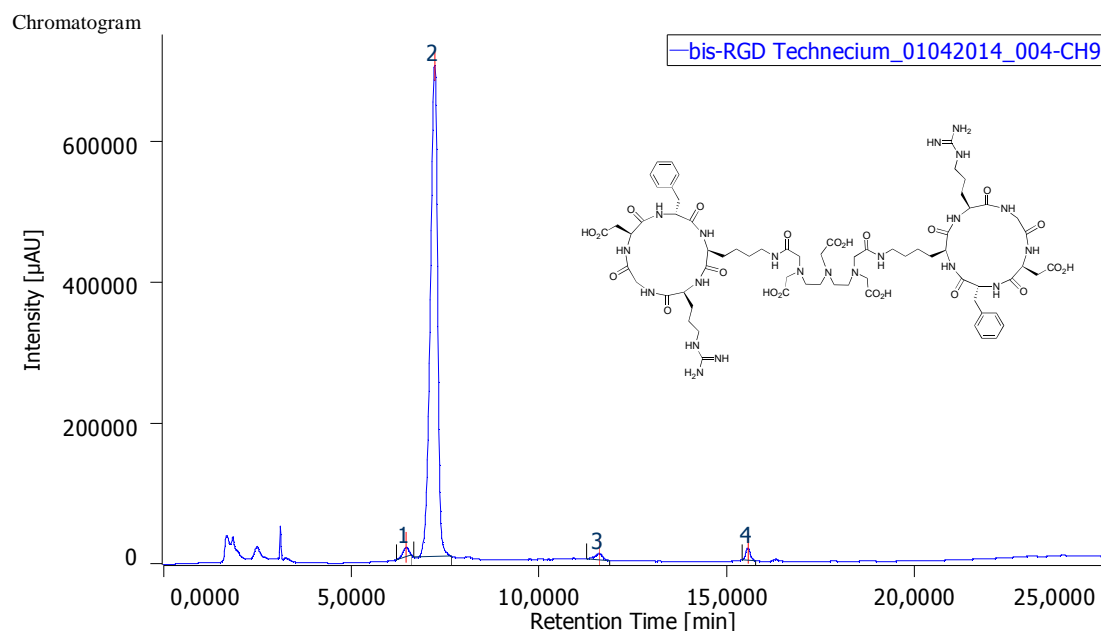
Sample Name bis cRGDfK prot 2013

Channel Name 220,0nm

#	Peak Name	CH	tR [min]	Area [μV·sec]	Height [μV]	Area%	Height%	Symmetry Factor
1	Unknown	9	17,387	1063966	80920	3,710	3,865	0,992
2	Unknown	9	22,613	25001322	1840539	87,170	87,912	0,884
3	Unknown	9	27,080	2615766	172168	9,120	8,223	0,975

Figure 13 : Profil CLHP du DTPA-bis-c(R(Pbf)GD(tBu)fK)

L'analyse chromatographique par CLHP est pratiquée sur la forme protégée, DTPA-bis-c(R(Pbf)GD(tBu)fK), et déprotégée DTPA-bis-c(RGDfK). La colonne utilisée est une colonne Luna C18 (250 mm x 4,6 mm x 5 μm). La phase mobile est initialement composée de NH₄OH 50 mM/MeOH (95/5), puis sur 30 minutes d'un gradient linéaire allant jusqu'à NH₄OH 50 mM/MeOH (5/95). Le débit est de 1 mL.min⁻¹ (Figures 13 et 14).



Channel & Peak Info.Table

Chromatogram Name bis-RGD Technecium_01042014_004-CH9

Sample Name bis cRGDfK 2013

Channel Name 220,0nm

#	Peak Name	CH	tR [min]	Area [μV-sec]	Height [μV]	Area%	Height%	Symmetry Factor
1	Unknown	9	6,467	138915	12559	1,440	1,710	0,812
2	Unknown	9	7,227	9227653	695540	95,658	94,720	0,808
3	Unknown	9	11,600	131970	8920	1,368	1,215	0,839
4	Unknown	9	15,547	147974	17294	1,534	2,355	1,024

Figure 14 : Profil CLHP du DTPA-bis-c(RGDfK)

2. Etude de la fixation du DTPA-bis-c(RGDfK) sur récepteurs (Test de binding)

2.1. Matériels et méthodes

Dans un premier temps, afin de s'assurer de la pertinence de ce travail, l'affinité et la spécificité du DTPA-bis-c(RGDfK) sont évaluées *via* un test de couplage ou binding. L'échistatine radiomarquée à l'iode 125 est utilisée comme radioligand spécifique de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (81,4 TBq/mmol, 14,7 kBq/μg) et l'échistatine froide est considérée comme la molécule de référence, selon une méthode précédemment décrite [188]. Les c(RGDfK) et c(RADfK) (GeneCust) sont testés en tant que respectivement, compétiteur de la fixation de l'intégrine et contrôle négatif.

Brièvement, une solution d'intégrine $\alpha_v\beta_3$ humaine à 20 ng.mL^{-1} est préparée dans du tampon de « coating » (Tris 20 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, MnCl_2 1 mM). Des aliquots de 100 μL sont répartis dans les puits de plaques de filtration 96 puits (Millipore, 96-well multiscreen IP filter plates, pores de 0,45 μm) et incubés toute la nuit à 4 °C. Les plaques sont ensuite lavées par du tampon de saturation (Tris 50 mM, pH 7,4, NaCl 100 mM, CaCl_2 2 mM, MgCl_2 1 mM, MnCl_2 1 mM, 1 % de sérum albumine humaine (BSA)), puis mises à incuber 2 heures à température ambiante avec 150 μL par puits de ce même tampon. Les plaques sont lavées deux fois, puis une incubation de 3 heures à température ambiante sous agitation est lancée avec de l' ^{125}I -échistatine (30 pM par puits, 2500 Bq.mL^{-1} , 500 Bq par puits) en présence de concentrations croissantes des différents compétiteurs (0 – 100 $\mu\text{mol.L}^{-1}$). Le volume de chaque puits est ajusté à 200 μL . Le dispositif d'aspiration Millipore est alors utilisé (Millipore, multiscreen vacuum manifold), et le radioligand non lié est éliminé au cours de trois rinçages successifs. Les filtres sont collectés et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un gamma-compteur (Packard COBRA II, Packard Instruments). La fixation non-spécifique est déterminée en présence d'un excès d'échistatine froide (facteur 1000), et est soustraite à la fixation totale afin d'évaluer la liaison spécifique.

2.2. Résultats

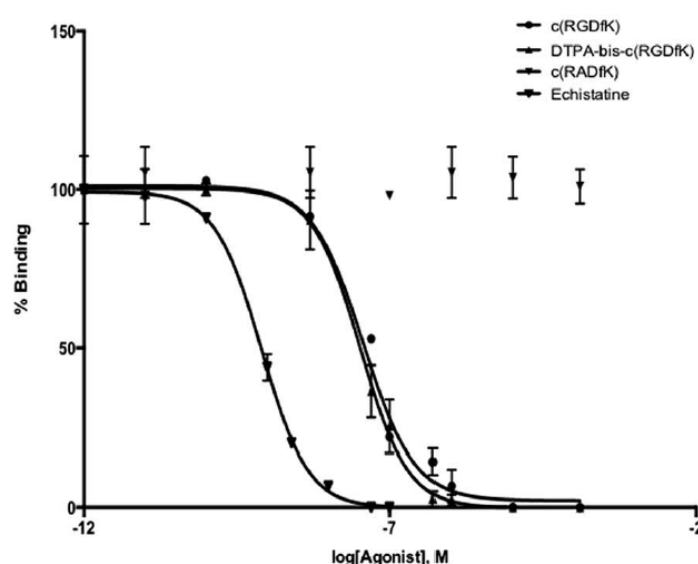


Figure 15 : Détermination de l'affinité du traceur technétiié. Etude de déplacement de la liaison aux récepteur de l' ^{125}I -échistatine par des concentrations croissantes de DTPA-bis-c(RGDfK), d'échistatine, de c(RGDfK) ou de c(RADfK)

Cette technique permet d'estimer la concentration inhibitrice 50 (IC₅₀) du traceur. Les récepteurs, c'est-à-dire l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, sont coatés sur les filtres des plaques de filtration 96 puits de Millipore. L'échistatine radiomarquée est ensuite ajoutée en présence ou non de compétiteurs. Chaque donnée ici présentée correspond à la moyenne de trois valeurs et chaque expérience a été répétée trois fois (**Figure 15**). Sans récepteurs fixés au niveau des puits, aucune interaction n'est détectée, ce qui indique l'absence d'adsorption non spécifique sur les microplaques. La concentration inhibitrice 50 est calculée par régression non-linéaire en utilisant le logiciel Prism® (GraphPad Software Inc.). Le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) et les contrôles positifs inhibent la liaison de l' ^{125}I -échistatine à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ de façon dose-dépendante. Les IC₅₀ respectives de l'échistatine, du DTPA-bis-c(RGDfK), du c(RGDfK) et du c(RADfK) sont de $0,79 \pm 0,29 \text{ nmol.L}^{-1}$, $32,86 \pm 7,83 \text{ nmol.L}^{-1}$, et $46,83 \pm 14,74 \text{ nmol.L}^{-1}$. Le contrôle négatif, c(RADfK) n'a pas déplacé la fixation de l'échistatine radiomarquée, même aux concentrations testées les plus élevées. Le radiotraceur présente une forte affinité pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces résultats sur récepteurs ont par la suite été confirmés sur cellules.

3. Radiomarquage et purification de l'acide diéthylène triamine penta-acétique-bis-c(RGDfK) par le technétium 99 métastable

3.1. Matériels et méthodes

1,56 mg de DTPA-bis-c(RGDfK) (1 μmol) est synthétisé au sein de notre laboratoire, puis dissous dans 200 μL d'eau pour préparation injectable (EPPI). A 50 μL de cette solution (soit 390 μg de DTPA-bis-c(RGDfK)), 100 μL d'étain (II) dans de l'acide acétique 10 % ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 5 mg.mL^{-1}) sont ajoutés. Le technétium est obtenu à partir d'un générateur commercial $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ (Elumatic III, IBA international). 500 μL de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (360 MBq) fraîchement élués sont additionnés. Le pH du milieu réactionnel est ajusté à 7 grâce à une solution de Na_2CO_3 (0,1 M, 900 μL). La solution finale est chauffée durant 45 minutes à 95 °C.

Après refroidissement, le complexe technétié est ensuite purifié à l'aide d'une cartouche Oasis C18 HLB ((Hydrophylic Lipophylic Balanced, Waters), préalablement activée avec 5 mL d'éthanol, puis 20 mL d'EPPI. Le milieu réactionnel est chargé sur la cartouche, qui est ensuite lavée avec 10 mL d'EPPI. Le composé radiomarqué est élué par 2

mL d'éthanol. Les solvants sont éliminés par chauffage à 80 °C durant 5 minutes sous un courant d'azote. Le volume de la solution de ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) (≈ 165 MBq) est ajusté à l'aide de NaCl 0,9 %.

La pureté radiochimique (PRC) est déterminée par chromatographie couche mince (CCM) sur plaques ITLC-SG (Pall Corporation) avec pour phase mobile soit de l'acétone ou un mélange acétone/NaCl 0,9 % (1/1). Avec l'acétone, le $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migre en front de solvant alors que le ^{99m}Tc réduit et le complexe formé restent au dépôt. Avec le mélange acétone/NaCl 0,9 % (1/1), le complexe et le pertechnétate migrent avec un R_f de 0,9, alors que le ^{99m}Tc réduit reste au dépôt. La pureté radiochimique est alors définie par l'équation suivante : $\text{PRC (\%)} = 100 - [^{99m}\text{TcO}_4^- (\%) + ^{99m}\text{Tc réduit (\%)}]$. La pureté du radiotraceur a également été vérifiée par CLHP (colonne Luna C₁₈ (250 mm x 4,6 mm x 5 μm , CH₃CN/NH₄OH 0,2 % (40/60), débit 0,5 mL/min).

3.2. Résultats

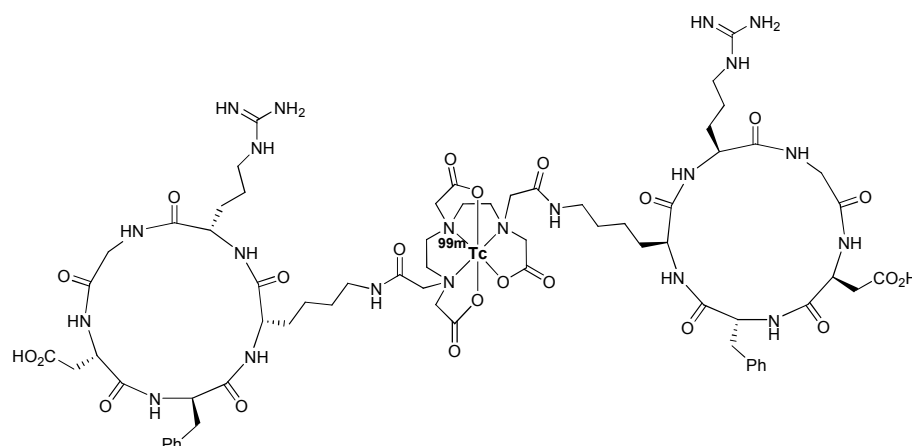


Figure 16 : Schéma du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK)

Le radiomarquage du DTPA-bis-c(RGDfK) au ^{99m}Tc est obtenu en 45 minutes à 95 °C (**Figure 16**). Le rendement radiochimique initial du produit était limité, de l'ordre de 20 %. La réaction a alors été optimisée en évaluant différentes quantités de réducteur (SnCl_2 : 0,1 mg à 1 mg), et aussi différents réducteurs (SnCl_2 , $\text{SnC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), en modifiant les quantités de précurseurs ainsi que les ratios précurseurs/réducteurs. La durée de chauffage a elle aussi fait l'objet d'ajustements. Afin d'accroître la pureté radiochimique, une filtration sur Sep-Pak C18 a été réalisée. Toutefois, cette étape de purification, à l'origine d'une perte de traceur, est désormais pratiquée sur cartouche Oasis HLB (Waters), permettant de conserver la qualité du

produit final, mais aussi de conduire à une augmentation significative du rendement radiochimique.

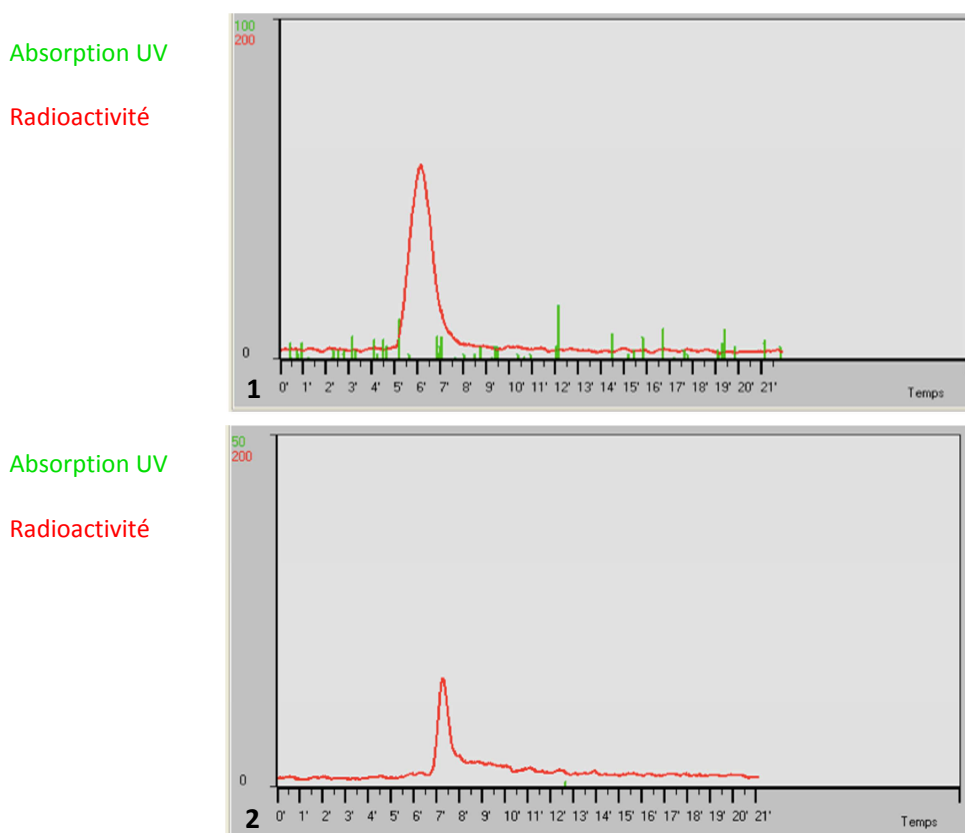


Figure 17 : Contrôle CLHP de la pureté radiochimique du radiotracer. (1) ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), $R_t = 6,0 - 6,3$ minutes (2) Technétium réduit (colonne Luna C_{18} (250 mm x 4,6 mm x 5 μm), éluant $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{OH}$ 0,2 % (40/60), débit de 0,5 mL/min)

Les meilleurs résultats sont obtenus avec la mise en jeu de 390 μg de DTPA-bis-c(RGDfK) et 50 μg de SnCl_2 . La pureté radiochimique résultante est $> 95 \%$ avec une activité spécifique de $1475 \text{ GBq} \cdot \text{mmol}^{-1}$ et un rendement de marquage, non corrigé de la décroissance, d'environ 45 % ($n = 10$). Les résultats de la CLHP témoignent d'un temps de rétention pour le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) de 6,2 minutes ($R_t = 6,0 - 6,3$ minutes). Le technétium réduit constitue la principale impureté radiochimique de la préparation (**Figures 17, 18 et annexe 2**).

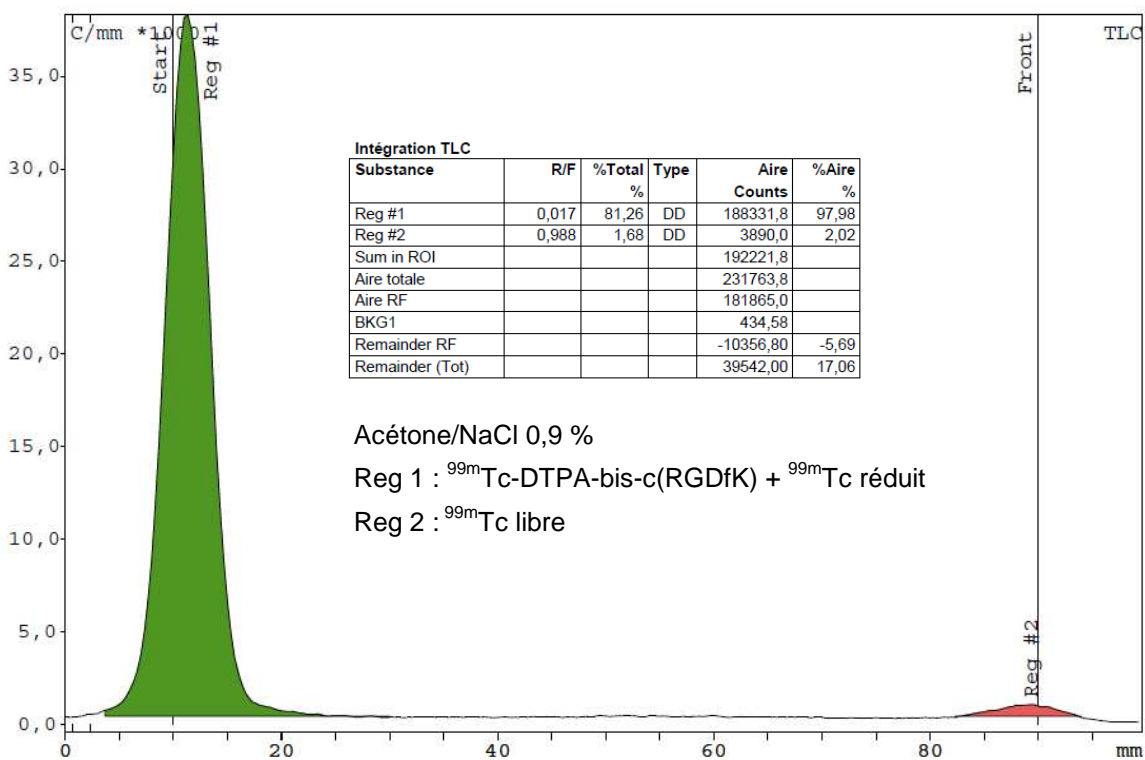
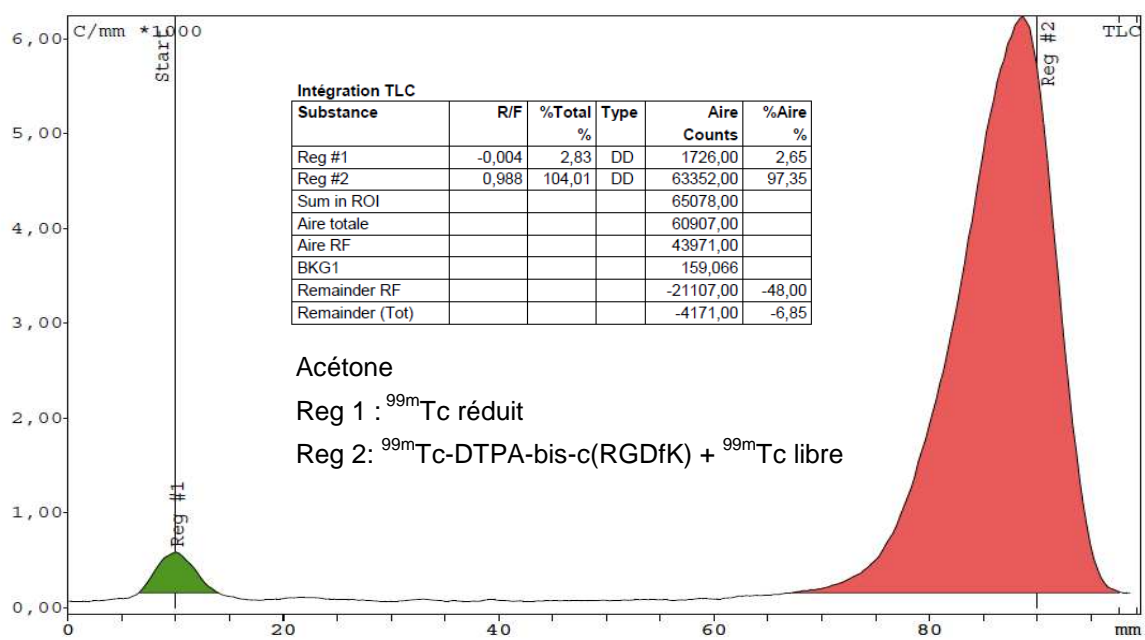


Figure 18 : Evaluation de la pureté radiochimique du traceur par chromatographie couche mince (CCM) sur plaques ITLC-SG (Pall Corporation) avec pour phase mobile de l'acétone ou un mélange acétone/NaCl 0,9 % (1/1)

4. Log P du dérivé technétié

4.1. Matériels et méthodes

Le coefficient de partage est déterminé en mélangeant 0,5 mL de ^{99m}Tc -peptide-RGD en solution dans du PBS (Phosphate Buffer Saline) 0,01 M à 0,5 mL d'octanol dans un tube Eppendorf. Le tube est vortexé, puis centrifugé à 5000 g pendant 3 minutes. Des aliquots de 100 μL de chacune des phases, aqueuse et d'octanol, sont prélevés et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un gamma compteur (Packard COBRA II, Packard Instruments). Le log P est calculé selon la formule suivante : $\log P = [(\text{Activité phase octanol}) / (\text{Activité phase aqueuse})]$.

4.2. Résultats

Le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) présente un caractère hydrophile marqué par un log P évalué à -1,78 ($n = 3$), en accord avec le temps de rétention obtenu en CLHP.

5. Analyse de la stabilité radiochimique

5.1. Matériels et méthodes

La stabilité du composé radiomarké est évaluée par CCM (ITLC-SG, Pall Corporation) et à l'aide d'un radiochromatographe Raytest miniGITA. Selon les mêmes modalités que celles indiquées lors de l'étude de la pureté radiochimique, la stabilité du composé est contrôlée à 30, 60, 120 et 180 minutes après radiomarkage. Les résultats sont exprimés en pourcentage de ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) persistants à ces différents intervalles de temps.

5.2. Résultats

L'étude de stabilité porte sur une durée de 3 heures avec des contrôles de la pureté radiochimique réalisés par CCM à différents intervalles de temps après préparation (0, 30, 60, 120 et 180 minutes). Les résultats de ces contrôles restent inchangés sur la période d'étude, et

le pourcentage de ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) persistant est de $95 \pm 3,0 \%$. Durant ces trois heures, aucun relargage significatif de technétium, ni la présence de peptides de dégradations n'ont été détectés.

6. Etudes cellulaires

6.1. Matériels et méthodes

6.1.1. Cultures cellulaires

6.1.1.1. Les lignées cellulaires

- C6 : cellules de gliome de rat, utilisées comme témoin négatif de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces cellules sont initialement produites par injection hebdomadaire de *N*-nitrosométhylurée chez l'animal (ATCC référence # CCL-107).
- U87MG : cellules de gliome humain de l'adulte, utilisées comme témoin positif de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Il s'agit d'une lignée permanente établie à partir d'un sujet féminin de 44 ans atteint de glioblastome.
- SF188 : cellules de glioblastome humain de l'enfant étudiées lors de ce projet. Cette lignée permanente a été obtenue à partir d'un sujet masculin de 8 ans atteint d'un glioblastome. Les cellules ont été fournies par le laboratoire de Pharmacologie du Centre Oscar Lambret, Lille, France.
- B16F10 : cellules de mélanome murin issues de souris C57Black/6. Cette lignée est $\alpha_v\beta_3$ positive (ATCC référence # CCL-6322).
- SKMEL28 : cellules de mélanome de l'adulte. Cette lignée permanente est établie à partir d'un sujet masculin de 51 ans atteint de mélanome malin. Ces cellules nous ont été fournies par l'UMR 1037 de l'Institut Claudius Regaud, Toulouse, France.
- HEK293 : cellules humaines d'épithélium rénal embryonnaire. Ces cellules ont été fournies par l'INMAS, Delhi, Inde (Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences).

6.1.1.2. Les conditions de cultures

Les cultures ont été réalisées en boîtes de 10 cm de diamètre, incubées à 37 °C en atmosphère humide enrichie à 5 % de CO₂. Les milieux de cultures utilisés sont les suivants :

- C6 : milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Invitrogen) enrichi à 5 % de sérum de veau fœtal (SVF, GIBCO) et 1 % d'antibiotiques : pénicilline 100 UI.mL⁻¹ et streptomycine 100 µg.mL⁻¹ (Invitrogen).
- U87MG : milieu DMEM (Invitrogen) supplémenté à 10 % de SVF, 1 % d'acides aminés non essentiels (Hyclone AdvanceSTEM™) et 1 % d'antibiotiques : pénicilline 100 UI.mL⁻¹ et streptomycine 100 µg.mL⁻¹ (Invitrogen).
- SF188 : milieu DMEM (Invitrogen) enrichi à 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 % d'antibiotiques : pénicilline 100 UI.mL⁻¹ et streptomycine 100 µg.mL⁻¹ (Invitrogen).
- B16F10 : milieu DMEM 4,5 g glucose (Invitrogen) enrichi à 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % de glutamine (GlutaMAX™, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et 1 % d'antibiotiques : pénicilline 100 UI.mL⁻¹ et streptomycine 100 µg.mL⁻¹ (Invitrogen).
- SKMEL28 : milieu RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute) (Invitrogen) supplémenté à 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 1 % de glutamine (GlutaMAX™, Invitrogen, Cergy Pontoise, France) et 1 % d'antibiotiques : pénicilline 100 UI.mL⁻¹ et streptomycine 100 µg.mL⁻¹ (Invitrogen).
- HEK293 : milieu DMEM (Invitrogen) enrichi à 10 % de SVF et pénicilline 50 UI.mL⁻¹, streptomycine 50 µg.mL⁻¹, nystatine 2 µg.mL⁻¹ (Invitrogen).

Les cellules sont mises en culture jusqu'à atteindre 80 % de confluence. Les cellules sont enfin comptées et remises en suspension dans leur milieu de culture additionné de 0,1 % de BSA, Hepes 20 mM pH 7,4.

6.1.1.3. Congélation/décongélation cellulaire

Afin de conserver du matériel pour de prochaines études, les cellules ont été congelées tout au long de notre travail. Les lignées ont également fait l'objet de décongélation.

Le procédé est identique pour les différentes lignées cellulaires.

6.1.1.3.1. Congélation des cellules

Le surnageant de la boîte de culture est éliminé, et le tapis cellulaire est lavé avec du PBS 1 X stérile. Les cellules sont ensuite décollées par 2 mL de trypsine-EDTA (Acide Ethylène Diamine Tétra-Acétique) 0,5 %, et incubées 2 minutes à 37 °C. L'action de la trypsine est alors inhibée par l'ajout de 3 mL de milieu enrichi par du SVF. Le milieu et les cellules sont récupérés, et mis à centrifuger à 1200 rotations par minutes (rpm) pendant 5 minutes. Dans la glace, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est repris par 1 mL de SVF. La suspension est homogénéisée, puis 20 µL sont prélevés afin de dénombrer les cellules sur cellule de Malassez. Enfin, 1 mL de SVF-DMSO (DiMéthyl SulfOxyde) est ajouté, la suspension est homogénéisée, puis répartie dans différents cryotubes, disposés dans de la glace et placés rapidement à -80 °C.

6.1.1.3.2. Décongélation des cellules

Le milieu de culture (adapté au type cellulaire) est déposé au-dessus du contenu d'un cryotube. L'ensemble est ensuite mélangé puis prélevé et centrifugé à 1200 rpm pendant 5 minutes. Le surnageant, contenant notamment le DMSO, est éliminé et le culot est repris à l'aide de 1 mL de milieu de culture. 20 µL sont prélevés afin de dénombrer les cellules sur cellule de Malassez. La suspension est enfin homogénéisée et mélangée à un volume suffisant de milieu pour permettre l'ensemencement.

6.1.2. Analyse immunocytochimique

Les différentes lignées cellulaires sont évaluées concernant l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les cellules C6, U87MG, SF188, B16F10, et SKMEL28 sont ensemencées dans des chambres de culture de 4 puits Lab-Tek™ jusqu'à 80 % de confluence (2×10^4 cellules/puits). Après avoir retiré le milieu de culture de chaque chambre, les cellules sont fixées par du paraformaldéhyde 4 % dans du PBS 0,01 M. Suite à deux lavages (PBS 0,01 M, 2 x 5 minutes), les cellules sont perméabilisées par une solution de Triton 0,5 % dans du PBS 0,01 M. Les cellules sont à nouveau lavées (PBS 0,01 M, 2 x 5 minutes) et les sites non spécifiques sont saturés (2 heures, 10 à 20 % de SVF en PBS 0,01 M). Après lavage (PBS 0,01 M, 2 x 5 minutes), l'anticorps primaire monoclonal murin LM609 anti- $\alpha_v\beta_3$ humaine (MAB1976, Millipore), dilué au 1/200, est déposé et les cellules sont mises à incuber en chambre humide (12 h, 4 °C). Le lendemain, les cellules sont lavées (PBS 0,01 M, 2 x 5 minutes), et l'anticorps

secondaire biotinylé anti-souris (BA 2000 Eurobio, AbCys Vector), dilué au 1/200, est appliqué durant 4 heures à température ambiante, en chambre humide. Les cellules sont lavées (PBS 0,01 M, 2 x 5 minutes), puis la révélation est effectuée par une solution d'extravidine-cyanine 3 diluée au 1/400 (1 heure dans l'obscurité). Les cellules sont enfin observées directement au microscope à fluorescence à contraste de phase avec ou sans immersion.

6.1.3. Cytométrie de flux

Les cellules sont cultivées comme précédemment décrit puis trypsinisées. L'action de la trypsine est arrêtée à l'aide de milieu enrichi avec 8 % de SVF. La suspension cellulaire est centrifugée, puis le culot cellulaire et les cellules sont répartis à raison de 1 million de cellules par mL d'une solution de PBS 0,01 M additionnée de 0,1 % de BSA et 0,1 mM EDTA. Le marquage s'effectue à 4 °C. Un volume de 100 µL de cette suspension est prélevé, et 10 µg.mL⁻¹ de l'anticorps primaire sont ajoutés (LM609, Millipore). Le tube est placé durant 15 minutes à l'obscurité et à 4 °C. Après centrifugation, le culot est lavé par 10 volumes de PBS froid. Les cellules sont ensuite présentées à 50 µL d'anticorps secondaire anti-anticorps murin couplé à un fluorochrome (FITC, Fluorescein IsoThioCyanate) (BD Biosciences) durant 15 minutes à 4 °C, à l'obscurité. Après deux étapes de centrifugation séparées par un lavage au PBS froid, le culot est repris dans 200 µL de tampon de marquage (PBS 0,01 M, BSA 0,1 %, 0,1 mM EDTA). Pour chaque expérience, différents tubes de contrôles sont réalisés en parallèle, d'une part, une préparation cellulaire de marquage dite non-spécifique dans laquelle les cellules n'ont été exposées qu'à l'anticorps secondaire couplé au fluorochrome, mais sans présentation à l'anticorps primaire, et d'autre part, les cellules seules, sans aucun contact avec les anticorps, préparées dans 200 µL du tampon réactionnel. Ce dernier tube est utilisé pour évaluer l'autofluorescence, qui est mesurée sur les cellules qui ont uniquement subi un lavage après trypsinisation. L'analyse est effectuée sur cytomètre en flux Becton Dickinson FACSCanto II.

6.1.4. Etude de la cytotoxicité

Un test au MTT (MéthylThiazole Tetrazolium) est pratiqué. Il mesure l'activité métabolique cellulaire des lignées U87MG et HEK293. Les cellules sont ensemencées en monocouche en présence du milieu de culture adapté, indiqué précédemment, et maintenues en atmosphère humide à 37 °C sous 5 % de CO₂ et 95 % d'air. Des microplaques de 96 puits

sont ensemencées avec une densité de 5000 cellules par puits. Un délai de 24 heures à 27 °C est alors laissé aux cellules afin de bien adhérer aux plaques.

Les cellules sont ensuite ensemencées à différentes concentrations de peptide (32 pM – 1 mM) durant des périodes de 2, 4, 6 et 12 heures. Chaque concentration est testée en triple exemplaire. A la fin du traitement, toutes les cellules, qu'il s'agisse des cellules exposées au peptide ou bien des contrôles négatifs, sont mises à incuber en présence de MTT à une concentration finale de 0,1 mg.mL⁻¹ pendant 2 heures à 37 °C. Cet essai colorimétrique se base sur la transformation (réduction) du sel jaune de tétrazolium en cristaux pourpres de formazan, du fait de l'activité métabolique cellulaire, ce qui donne une information quantitative et permet de déterminer le nombre de cellules vivantes.

Pour chaque puits, les cellules sont lysées et les cristaux de formazan sont dissous par 150 µL de DMSO appliqués durant 30 minutes. L'absorbance est lue à 570 nm avec un filtre de référence à 630 nm. La fraction de cellules survivantes est normalisée en tenant compte du contrôle négatif et de la moyenne des résultats par condition. La courbe représentative de la fraction de cellules survivantes en fonction de la concentration de peptide utilisée est représentée à 2 heures et 4 heures. La concentration inhibitrice 50 (IC₅₀) est calculée, et représente la quantité de traceur nécessaire pour tuer 50 % des cellules.

6.1.5. Etude de la fixation du radiotraceur et de son évolution au cours du temps sur cellules

Les études de fixation nécessitent l'ensemencement de plaques de filtration 96 puits (Millipore, 96-well multiscreen IP filter plates). Les plaques sont saturées durant 45 minutes à l'aide de tampon de couplage, c'est à dire, leur milieu culture additionné de 0,1 % de BSA, Hepes 20 mM pH 7,4. Suite à l'activation du système d'aspiration, le milieu est ensuite remplacé par 100 µL de suspension cellulaire (100000 cellules par puits). Les cellules sont incubées durant différents temps, de 15 à 180 minutes, à 37 °C, 3 puits par condition, et avec soit, le radiotraceur dilué dans du tampon de couplage (100 µL, 1 MBq.mL⁻¹, fixation totale), soit 20 µM d'échistatine associées au radiotraceur (100 µL, 1 MBq.mL⁻¹, fixation non spécifique). L'incubation est interrompue par aspiration, le milieu étant rapidement éliminé, les puits sont lavés deux fois (PBS froid, 0,01 M, 200 µL). Les filtres sont enfin collectés individuellement dans des tubes à hémolyse, et la radioactivité cellulaire est mesurée à l'aide d'un gamma-compteur COBRA II. Les résultats inter-puits sont corrigés de la décroissance et

ajusté à 2000000 de cellules par puits. La comparaison des données cellulaires obtenues lors du radiomarquage au ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) a été réalisée à l'aide d'un test ANOVA d'analyse de variance.

6.1.6. Test de binding du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) sur cellules

Cette procédure est réalisée sur cellules U87MG ($\alpha_v\beta_3$ positives) en utilisant des concentrations croissantes de DTPA-bis-c(RGDfK) radiomarké. Les cellules sontensemencées sur des plaques de 48 puits à raison de 12000 cellules par puits, et trois exemplaires de chaque condition sont préparés. Le jour de l'expérience, le milieu de culture de chaque puits est éliminé et remplacé par 1 mL de solution HBSS (Hank's Balanced Salt Solution). Des concentrations croissantes (0,001 – 10 nM) de ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) sont additionnées à chaque puits. Les cellules sont incubées en présence ou non d'un excès d'un facteur 100 de compétiteur froid, c(RGDfK), pendant 40 minutes à 37 °C. Les cellules sont ensuite lavées 4 fois par un tampon de lavage (Tris-HCl 50 mM, BSA 0,2 %, NaCl 30 mM). La courbe de Scatchard est établie en évaluant le rapport des fractions de ligand lié/ligand libre en fonction de la concentration en ligand lié.

6.2. Résultats

6.2.1. Etudes cellulaires du DTPA-bis-c(RGDfK)

6.2.1.1. *Analyse immunocytochimique et cytométrie de flux*

Les études immunocytochimiques sont réalisées en vue de caractériser nos lignées cellulaires quant à l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces techniques reposent sur l'utilisation de l'anticorps primaire monoclonal murin anti- $\alpha_v\beta_3$ humaine LM609 en association avec un témoin $\alpha_v\beta_3$ positif, U87MG, et un témoin $\alpha_v\beta_3$ négatif, C6.

Afin de permettre une comparaison optimale, l'observation des différentes lignées cellulaires a été effectuée avec des réglages identiques du microscope à fluorescence (gain, saturation, exposition, gamma, à immersion, grossissement x63). Les résultats sont également comparés à des techniques identifiant la liaison non spécifique (NSB), c'est à dire faites dans des conditions similaires mais sans l'utilisation de l'anticorps primaire LM609 (**Figure 19**).

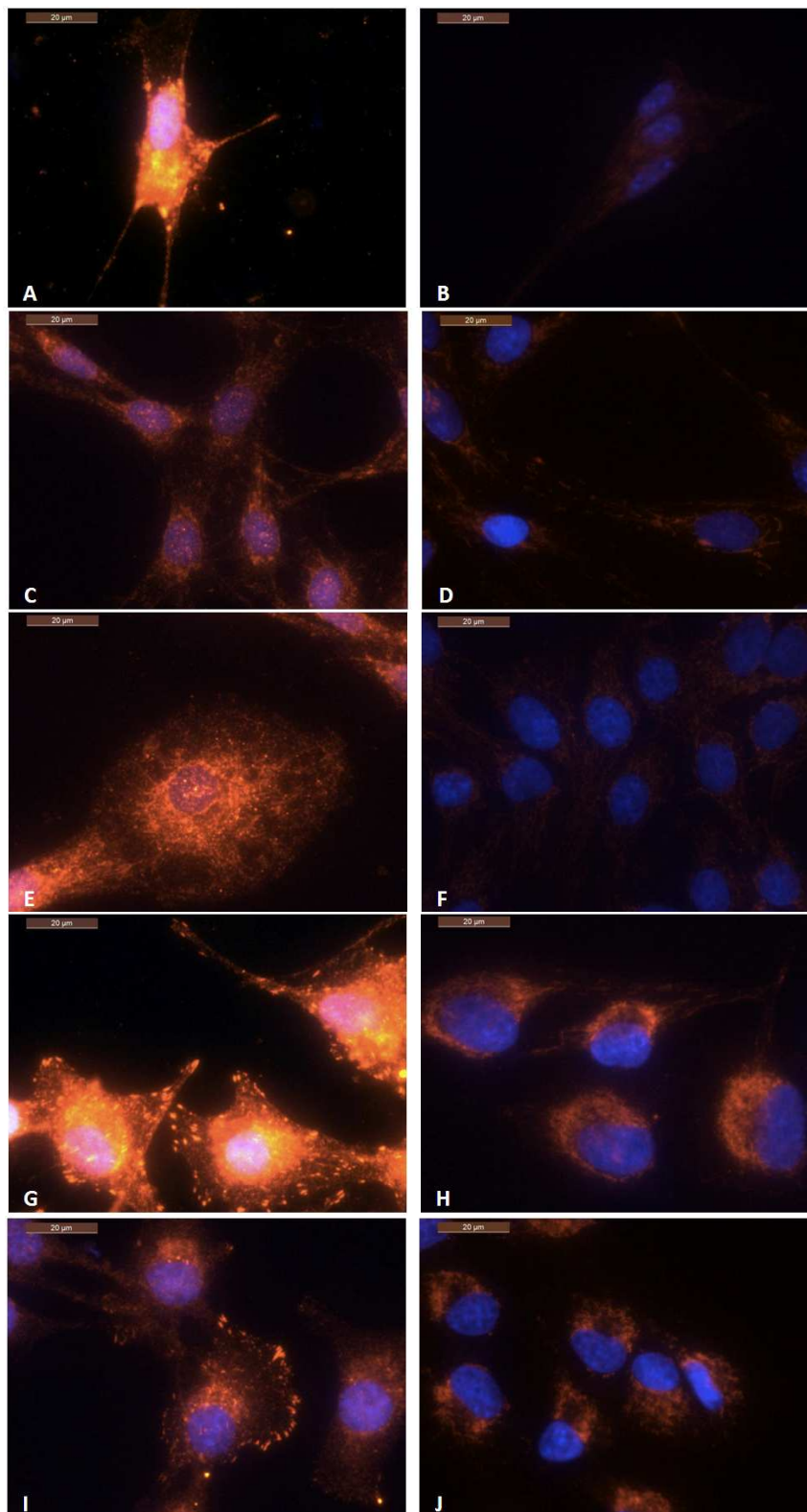


Figure 19 : Immunofluorescence des différentes lignées cellulaires (Photographies à immersion, grossissement x63). (A) B16F10, (B) B16F10 NSB, (C) C6, (D) C6 NSB, (E) SF188, (F) SF188 NSB, (G) SKMEL28, (H) SKMEL28 NSB, (I) U87MG, (J) U87MG NSB

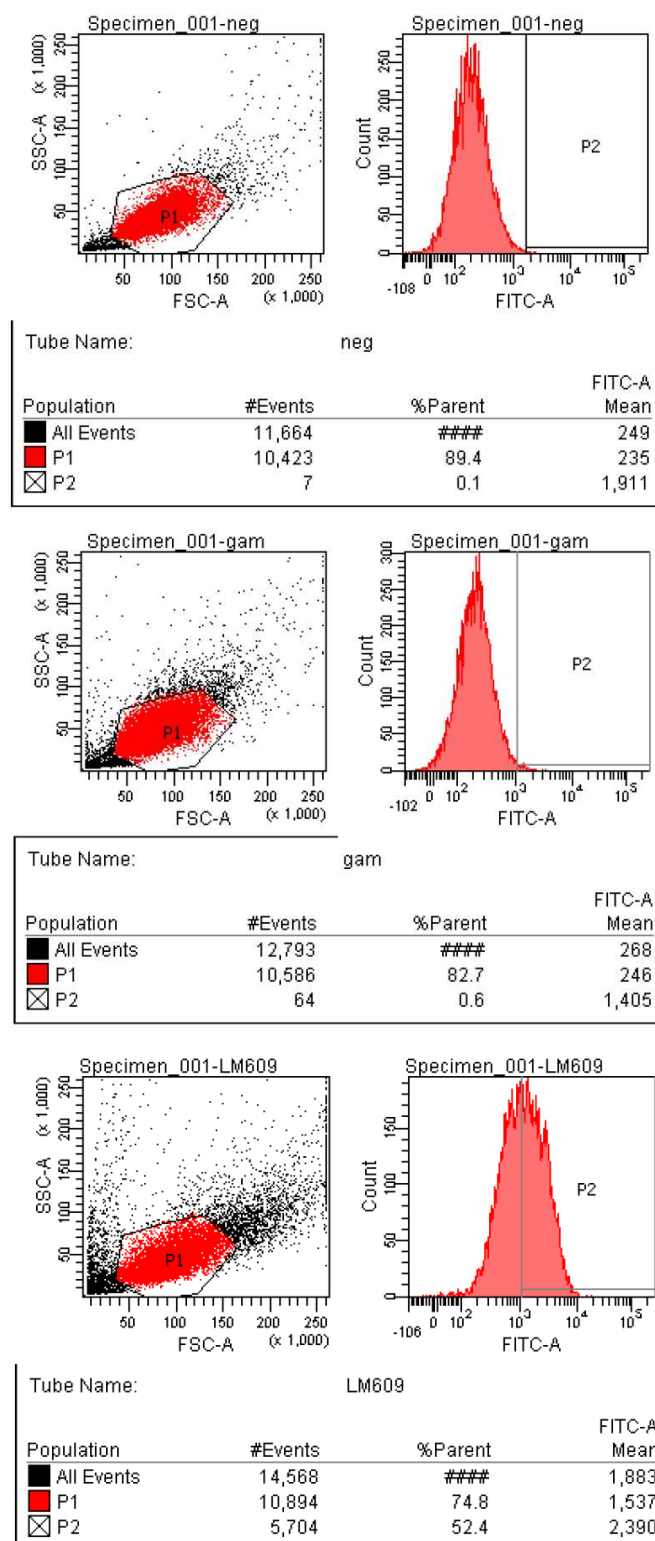


Figure 20 : Validation par cytométrie de flux de nos lignées cellulaires quant à l'expression de l'intégrine $\alpha_5\beta_3$: exemple des cellules U87MG

Les cellules C6 se sont effectivement révélées négatives. Les cellules U87MG présentent de nombreux points de fixation membranaires de l'anticorps, ce qui tend à valider notre technique. Les cellules SKMEL28 présentent de nombreux clusters membranaires

notamment au niveau des expansions cellulaires témoignant de la présence de l'intégrine au niveau des plaques d'ancrage. Des amas fluorescents membranaires caractéristiques de $\alpha_v\beta_3$ sont également identifiés pour les cellules B16F10. Néanmoins, les cellules SF188 ne présentent que quelques fixations soulignant une expression limitée de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$.

L'expression de l'intégrine est également confirmée par cytométrie de flux sur cytomètre en flux Becton Dickinson FACSCanto II (**Figure 20**).

6.2.1.2. Etude de cytotoxicité

La toxicité cellulaire du DTPA-bis-c(RGDfK) est évaluée sur cellules U87MG et HEK293 ($\alpha_v\beta_3$ positives) à l'aide d'un test au méthylthiazole tétrazolium. Les valeurs représentées au niveau des différents tracés correspondent aux moyennes de trois expériences.

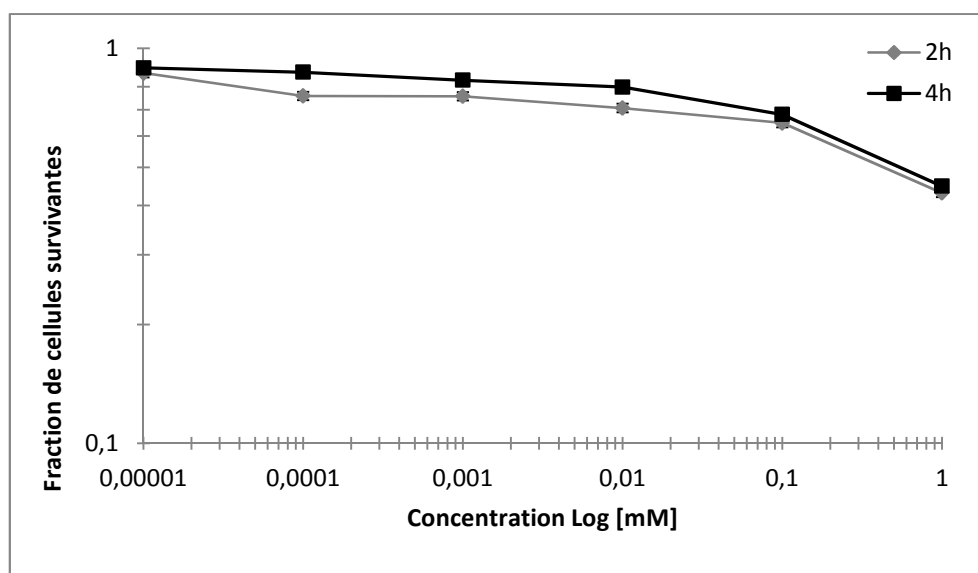


Figure 21 : Etude de la toxicité du traceur sur cellules U87MG, exposées à différentes concentrations de DTPA-bis-c(RGDfK) pendant des intervalles de temps de 2, 4, 6, et 12 h

Les cellules exposées au conjugué DTPA-bis-pharmacophore présentent une mort cellulaire dose-dépendante statistiquement significative au-delà de 1 mM de peptide.

Les valeurs d' IC_{50} pour le traceur sont de $0,81 \pm 0,03$ mM pour les cellules U87MG, et de $1,02 \pm 0,03$ mM pour les cellules HEK293 (**Figures 21 et 22**).

La concentration du radiotraceur utilisée dans les différentes études est de l'ordre de $0,68 \mu\text{M}$. Par conséquent, avec une IC_{50} de 1,02 mM, le traceur peut être considéré comme sans danger et non-toxique en tant qu'agent diagnostique.

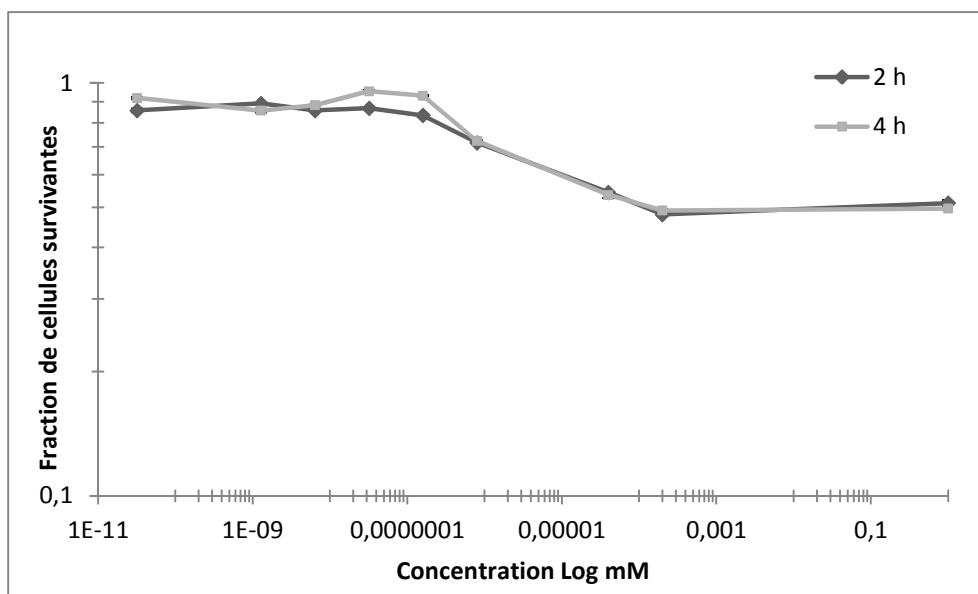


Figure 22 : Etude de la toxicité du traceur sur cellules HEK293. Les cellules sont exposées à différentes concentrations de DTPA-bis-c(RGDfK) pendant différents intervalles de temps : 2, 4, 6, et 12 h

6.2.2. *Evaluation du radiotracer ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) au niveau cellulaire*

Dans un premier temps, la fixation du radiotracer a été évaluée sur cinq lignées cellulaires (C6, B16F10, SKMEL28, SF188, U87MG). L'activité volumique du peptide ajustée à 1 MBq.mL^{-1} permet d'obtenir des résultats satisfaisants en termes de signal sur bruit de fond. Les résultats obtenus indiquent une fixation augmentant au cours du temps quel que soit le type cellulaire.

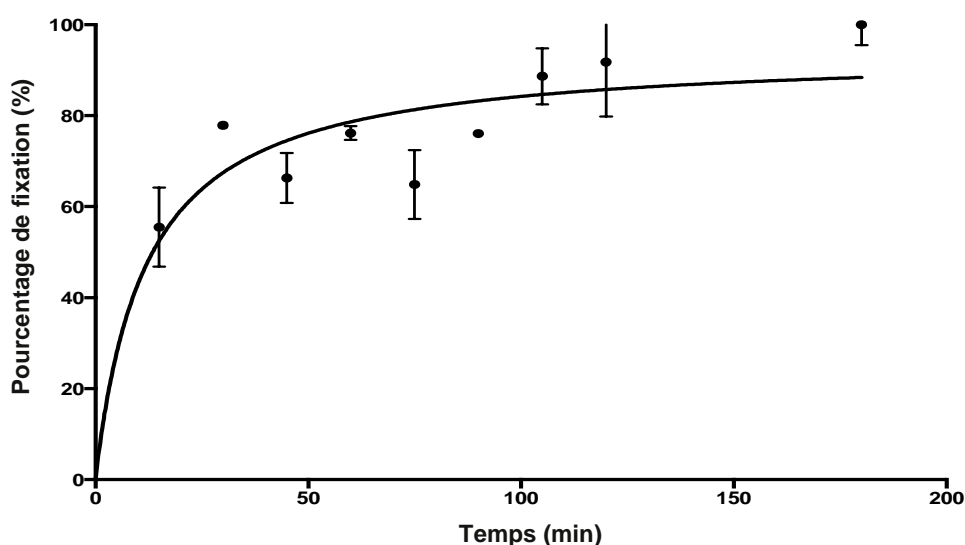


Figure 23 : Cinétique de fixation du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) chez les cellules B16F10. L'étude de la fixation cellulaire est suivie sur 180 minutes. L'état d'équilibre est atteint à 90 minutes

L'analyse de variance (test ANOVA) des résultats des différentes lignées cellulaires montre une différence significative ($p < 0,0001$) pour les paramètres temps et temps/concentration. De même, une différence significative ($p < 0,05$) est également observée pour le paramètre temps/lignée cellulaire. Pour les différentes lignées cellulaires, la fixation du traceur au cours du temps se caractérise par l'obtention d'un plateau de fixation à 90 minutes après injection (**Figure 23**).

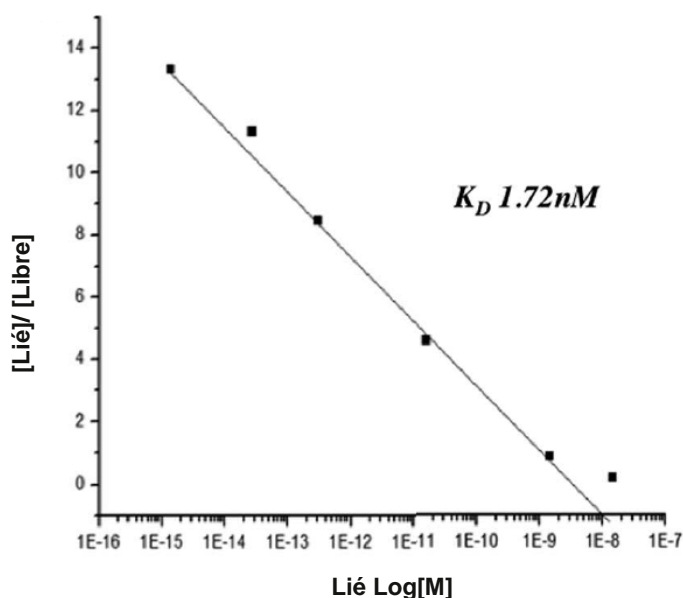


Figure 24 : Détermination de l'affinité du traceur technétisé. Test de binding sur cellules U87MG avec des concentrations croissantes de ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK)

Les résultats des tests de couplage réalisés initialement sur récepteurs ont été confirmés par une analyse sur cellule U87MG. Le K_d du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) est de $1,72 \pm 0,12$ nM, ce qui confirme la haute affinité du traceur pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (**Figure 24**).

7. Analyse ex vivo sur coupes tissulaires

7.1. Matériels et méthodes

7.1.1. Analyse immunohistochimique sur coupes de tumeurs

Différentes coupes histologiques de tumeurs $\alpha_v\beta_3$ positives et négatives ont été testées. Les pathologies ciblées restent le gliome et le mélanome (naevus, mélanome SSM, mélanome ALM, mélanome NM, mélanome de Dubreuilh, métastases, cerveau sain, glioblastome, astrocytome pilocytique, astrocytome anaplasique). Cette étude a été pratiquée en vue d'une

part, de valider l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comme cible d'intérêt, et d'autre part, de fournir un support de référence pour analyser les résultats des tests de radiomarquage sur coupes tissulaires. Des contrôles positifs et négatifs ont été inclus dans chaque série de lames traitées. Ce travail a été réalisé en collaboration avec le laboratoire d'anatomo-pathologie du Pr A. De Mascarel.

Pour ce qui est de la technique, différents paramètres ont fait l'objet d'ajustement afin d'optimiser la réponse : concentration de l'anticorps primaire (1/100, 1/200, 1/300), réalisation ou non de démasquage et épaisseur de coupe (5 μm - 10 μm).

In fine, les coupes de tissus paraffinées sont dégraissées dans deux bains successifs de xylène (5 et 3 minutes), puis réhydratées par immersion dans des bains de concentrations décroissantes d'éthanol (100°, 95°, 70°) et enfin dans de l'eau pour préparation injectable (2 x 5 minutes). A ce stade, certaines lames ont subi un démasquage des sites antigéniques, (tampon citrate de démasquage pH 6, 40 minutes, 98 °C), puis sont ramenées progressivement à température ambiante. Les lames sont ensuite rincées (EPPI, 2 x 5 minutes). La peroxydase endogène est inhibée par traitement dans le méthanol absolu avec 0,5 % d' H_2O_2 (30 volumes, 20 minutes). Les lames sont ensuite lavées (EPPI, 2 x 5 minutes) et immergées dans un bain de PBS 0,01 M, pH 7,4 (2 x 10 minutes). Les sites antigéniques sont exposés (HCl 0,1 M + pepsine 2 mg.mL^{-1} , 75 minutes). Cette pepsine est inactivée par l'intermédiaire de deux lavages successifs (EPPI, 2 x 5 minutes). Les coupes sont saturées (BSA 0,2 % dans du PBS 0,01 M, 30 minutes), puis exposées à l'anticorps primaire LM609 monoclonal murin anti- $\alpha_v\beta_3$ humaine (MAB1976, Millipore), à diverses dilutions en atmosphère humide (12 heures, 4 °C). Les lames sont ensuite lavées (PBS 0,01 M, 2 x 10 minutes), puis le second anticorps anti-souris (EnVision™ MultiLink, Dako) est appliqué en chambre humide à température ambiante durant 1 heure. Suite à 3 lavages (PBS 0,01 M, 10 minutes et 2 x 5 minutes), les coupes sont révélées à l'AEC (3-Amino-9-EthylCarbazole, ab64252, Abcam), un chromogène permettant une coloration rouge des zones d'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (10 minutes). Une contre-coloration est enfin réalisée à l'aide d'une solution d'hématoxyline diluée au 1/5 (5 minutes). Pour terminer, les coupes font l'objet d'un montage à l'eau.

7.1.2. Analyse ex vivo : radiomarquage de coupes tissulaires

Les types de coupes histologiques évalués sont les mêmes que ceux étudiés en immunohistochimie. A savoir dans le cadre de l'étude sur les mélanomes : nævus, mélanome SSM, mélanome ALM, et mélanome NM et métastases, et pour l'étude des gliomes : cerveau

sain, glioblastome et astrocytomes. Le nævus et le cerveau sain sont considérés comme témoins négatifs. Comme pour les techniques d'immunohistochimie, les lames sont déparaffinées par deux bains successifs dans du xylène (5 et 3 minutes), puis réhydratées par passages dans des bains d'alcool de titre décroissant (100°, 95°, 70°, 2 x 5 minutes), et enfin rincées à l'EPPI (2 x 5 minutes). Une fois préparées, les lames sont exposées au ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) à raison de 222 kBq à 296 kBq/40 μL durant 1 heure à 37 °C. Les lames sont ensuite rincées successivement dans des bains de PBS-Tween 0,05 % (2 x 5 minutes), puis à l'EPPI (2 x 5 minutes). La radioactivité fixée sur les coupes est ensuite visualisée et quantifiée au β -imageur 2000 (Biospace Lab) et au micro-imageur ($\mu\text{IMAGER}^{\text{TM}}$, Biospace Lab).

Pour s'assurer de la spécificité du marquage, des études de déplacements ont été réalisées. Les différentes étapes sont pratiquées de façon identique. Mais suite à l'incubation du radiotraceur, les lames, après rinçage, sont exposées à un compétiteur froid, le c(RGDfK) (40 μL , 1 mM) durant 90 minutes. Les étapes de rinçage dans des bains de PBS-Tween 0,05 % (2 x 5 minutes), puis d'EPPI (2 x 5 minutes) sont ensuite répétées et la radioactivité est mesurée au β -imageur 2000 (Biospace Lab) et au micro-imageur ($\mu\text{IMAGER}^{\text{TM}}$, Biospace Lab).

7.2. Résultats

7.2.1. Analyse immunohistochimique sur coupes de tumeurs

Les résultats obtenus sur les différents modèles de coupes tissulaires démontrent de meilleures performances, un meilleur rapport signal sur bruit de fond, avec une concentration d'anticorps primaire LM609 de 1/300, sans démasquage des sites et pour une épaisseur de coupe de 5 μm .

Différents tissus ont été testés concernant l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les contrôles négatifs, à savoir le nævus et le cerveau sain, $\alpha_v\beta_3$ négatifs, n'ont pas présenté de fixation de l'anticorps monoclonal LM609, ce qui indique l'absence de surexpression de l'intégrine d'intérêt et nous conforte quant à la validité de notre technique.

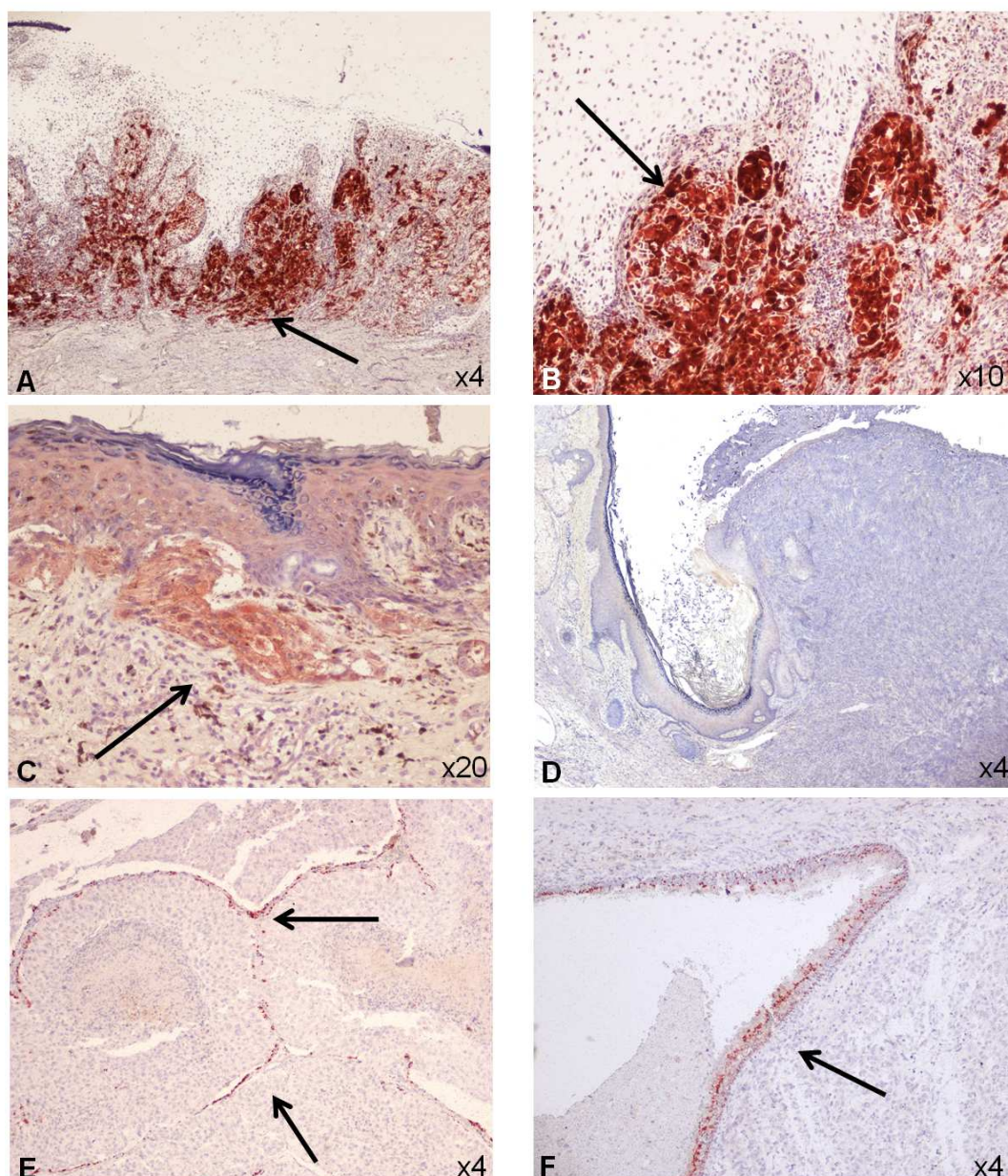


Figure 25 : Immunohistochimie sur coupes tissulaires de mélanomes et de métastases pulmonaires. Les flèches indiquent le marquage obtenu à l'aide de l'anticorps monoclonal murin anti- $\alpha_v\beta_3$ humaine LM609. (A) et (B) mélanome SSM, (C) mélanome de Dubreuilh, (D) mélanome nodulaire, (E) et (F) métastases pulmonaires

Le mélanome SSM montre une fixation importante au niveau de la zone jonctionnelle entre derme et épiderme. L'analyse de métastases pulmonaires a dévoilé une fixation des structures bronchiolaires péri-tumorales. Enfin, le mélanome de Dubreuilh témoigne également d'une expression de $\alpha_v\beta_3$ au niveau des cellules tumorales. Lors de cette étude, les résultats se sont avérés négatifs pour les lames de mélanomes ALM et NM, qui n'ont pas présenté de fixation significative et donc pas de surexpression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les différentes fixations observées sont principalement localisées au niveau des cellules tumorales ou de structures péri-tumorales (**Figure 25**).

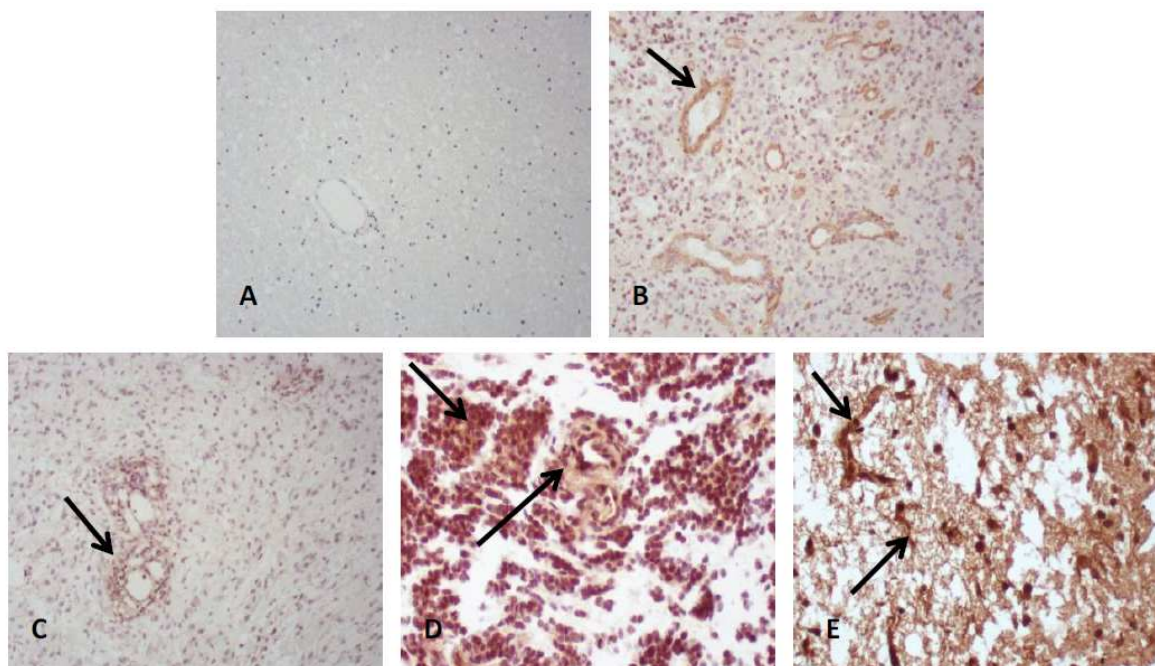


Figure 26 : Immunohistochimie sur coupes à l'aide de l'anticorps LM609 anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ humaine. Grossissement x20. (A) cerveau sain témoin négatif. (B) glioblastome d'adulte, témoin positif. (C) astrocytome pilocytaire pédiatrique (bas grade). (D) astrocytome anaplasique pédiatrique (haut grade). (E) glioblastome pédiatrique (haut grade)

Concernant l'étude des gliomes, l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ semble augmenter avec le grade la tumeur. La localisation de la cible est restreinte aux cellules endothéliales pour les tumeurs de bas grade, mais l'intégrine est plus largement présente pour les tumeurs de haut-grade, avec une expression à la fois au niveau de l'endothélium vasculaire mais aussi des cellules tumorales (**Figure 26**).

7.2.2. *Analyse ex vivo : radiomarquage de coupes tissulaires*

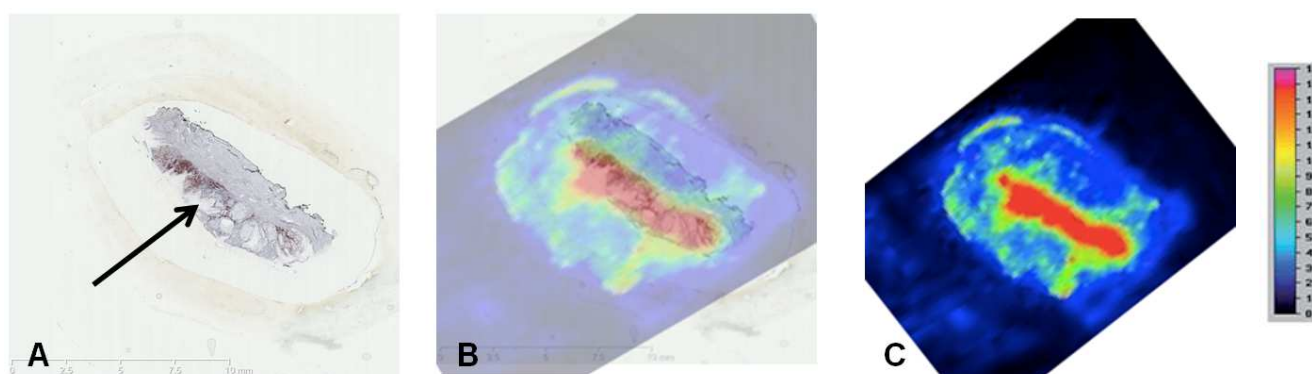


Figure 27 : Comparaison des résultats obtenus par radiomarquage au ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) et par immunohistochimie. (A) Immunohistochimie sur coupe de mélanome SSM avec l'anticorps monoclonal murin anti- $\alpha_v\beta_3$ humaine LM609, zone de marquage indiquée par la flèche noire. (B) Images fusionnées (C) Radiomarquage sur coupes de mélanome SSM

Le radiomarquage des coupes de mélanomes et de gliomes tend à confirmer les résultats précédemment obtenus en immunohistochimie. L'analyse sur β et micro-imageur a en effet montré une adéquation avec l'interaction de l'anticorps monoclonal LM609.

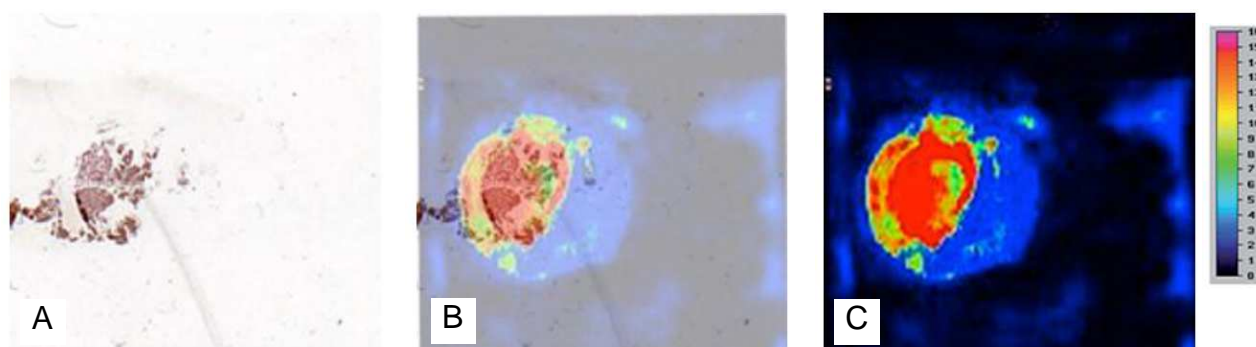


Figure 28 : Comparaison des résultats obtenus par radiomarquage au ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) et par immunohistochimie. (A) Immunohistochimie sur coupe d'astrocytome anaplasique avec l'anticorps monoclonal murin anti- $\alpha_v\beta_3$ humaine LM609. (B) Images fusionnées (C) Radiomarquage sur coupes au β -imageur

La fusion des images obtenues dévoile une bonne correspondance entre la fixation de l'anticorps anti- $\alpha_v\beta_3$ et le radiomarquage au ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) sur ces exemples de mélanome SSM, et d'astrocytome anaplasique (**Figures 27 et 28**).

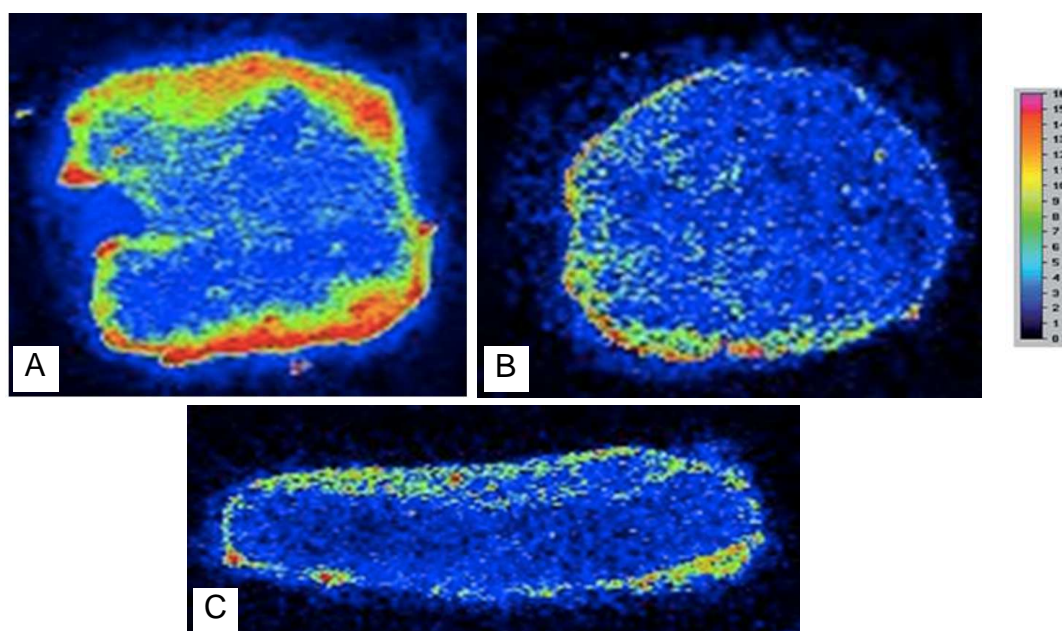


Figure 29 : Radiomarquage sur coupes tissulaires de mélanomes. La gamme de couleur du bleu au rouge indique une fixation croissante du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK). (A) Mélanome de Dubreuilh, (B) Mélanome nodulaire, (C) Mélanome ALM

De même, les mélanomes nodulaires et ALM, qui se sont révélés négatifs en immunohistochimie, n'ont également pas présenté de fixation significative du traceur (**Figure 29**).

Les études de déplacement réalisées sur coupes de gliome et de mélanome, en présence d'un excès de ligand froid c(RGDfK), confirment les résultats précédents du ciblage avec une très faible voire une absence de fixation spécifique du radiotracer (**Figure 30**). Ceci tend à souligner la spécificité du traceur technétié et à valider le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) pour l'imagerie et le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$

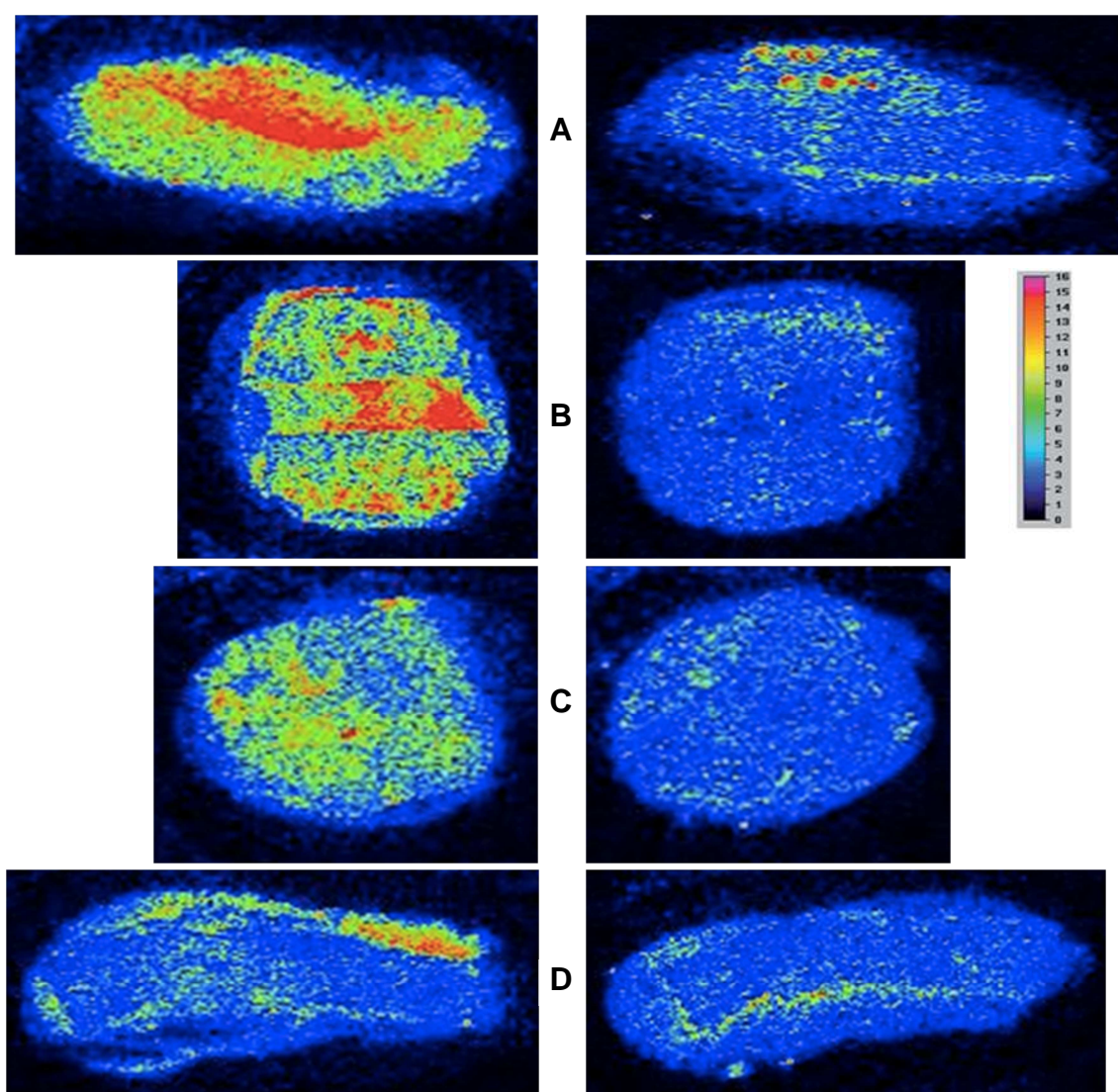


Figure 30 : Etude de déplacement du traceur technétié par un excès de ligand froid sur coupes tissulaires de mélanomes. La gamme de couleur du bleu au rouge indique une fixation croissante du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK). (A) Mélanome SSM, (B) Mélanome de Dubreuilh, (C) Mélanome nodulaire, (D) Mélanome ALM

8. Evaluation *in vivo* chez l'animal du peptide radiomarqué

8.1. Matériels et méthodes

Différents types de modèles tumoraux ont été utilisés pour l'étude *in vivo* chez l'animal de la biodistribution et de l'imagerie. La lignée C6 est utilisée comme contrôle négatif de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. La lignée cellulaire U87MG est utilisée comme témoin positif de son expression.

Après culture, le culot cellulaire est centrifugé (5 minutes, 200 g). Les cellules sont ensuite comptées et remises en suspension dans du NaCl 0,9 % stérile en vue d'une administration extemporanée chez l'animal.

L'imagerie TEMP est pratiquée sur des souris nude *nu/nu* femelles de 6-8 semaines (Charles River, L'Arbresle, France) en considérant différentes lignées cellulaires étudiées (U87MG, C6, B16F10). Les xénogreffes sont réalisées par injection sous-cutanée de 2×10^6 cellules en suspension dans un volume de 50 μ L (milieu de culture adapté au type cellulaire sans SVF). La croissance tumorale est laissée jusqu'à un volume de 150 mm³.

8.1.1. Imagerie TEMP-TDM chez la souris xénogreffée

L'imagerie TEMP permet une analyse séquentielle de haute sensibilité et une quantification. Cette étude est réalisée sur une caméra TEMP-TDM Symbia[®] T2 (Siemens HealthCare), et sur une caméra Triumph (GE HealthCare) triple modalité (TEP/TEMP/TDM) équipée d'un collimateur multipinhole N5F75A10. Les souris sont placées en position ventrale sur le support dédié de la caméra.

Chaque animal est anesthésié par injection intrapéritonéale d'une solution de kétamine (100 mg.kg⁻¹) et xylazine (10 mg.kg⁻¹).

Une activité moyenne de 18,5 MBq (≈ 1 MBq/g) de ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) de radiotraceur est injectée dans la veine caudale. L'activité résiduelle restant dans chaque seringue est quantifiée à l'activimètre.

Après un délai d'environ 30 minutes, les animaux toujours anesthésiés, sont disposés sur un support pour l'acquisition des données TEMP-TDM. Pour chaque expérience, des

régions d'intérêts (ROI) sont définies autour de chaque tumeur, des tissus sains et des principaux organes. La fixation est évaluée à l'aide du système FLEX SPECT™ version 1.0.7, avec une reconstruction en mode OSEM (Ordered Subset Expectation Maximization). Le traitement des images de la caméra Symbia® est effectué sur la station Syngo® MI Workplace. Symbia A (Siemens HealthCare). Le signal est analysé de manière visuelle ou semi-quantitative, et le volume fixant est également estimé à partir d'une segmentation. Le protocole d'acquisition comprend 3 tomographies de 10 minutes associées à un scanner suivi d'une tomographie de 30 minutes avec scanner, et enfin une séquence finale de 3 tomographies de 10 minutes associées à un scanner. La reconstruction TDM et les images TEMP sont fusionnées et analysées à l'aide du logiciel VIVID (Amira). Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale 150 minutes post-injection. Des contrôles négatifs sont intégrés à l'étude par l'intermédiaire de tumeurs xénogreffées C6 ($\alpha_v\beta_3$ négative).

Des tests de compétition ont également été effectués chez des souris nude athymiques implantées avec des tumeurs issues de la lignée U87MG $\alpha_v\beta_3$ positive, et chez qui, un large excès de compétiteur froid c(RGDfK) (101,7 μ g par kg de souris) a été co-injecté au radiotracer. L'acquisition des images de ces souris (tomographie de 15 minutes) est réalisée 1 heure après injection du radiotracer. L'analyse quantitative est effectuée à l'aide du logiciel Amide 1.0.4 et l'imagerie 3D grâce au logiciel VIVID (Amira).

8.1.2. Etudes de biodistribution

La biodistribution et les modalités d'élimination du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) sont appréhendées chez des souris xénogreffées de gliomes ou de tumeurs mélaniques ($n = 25$). La première approche repose sur l'imagerie scintigraphique *in vivo* en vue de vérifier l'accumulation du traceur dans la tumeur ainsi qu'au niveau des différents organes et de définir les principaux paramètres pharmacocinétiques et de distribution. D'autre part, une étude quantitative de biodistribution est faite en mesurant la radioactivité contenue dans les organes. Pour cela, les animaux sont sacrifiés à différents temps après injection, en moyenne à 1, 2 et 4 heures après administration. Les animaux, encore profondément endormis, sont euthanasiés par dislocation vertébrale, et les principaux organes d'intérêt sont prélevés afin de quantifier la biodistribution du radioligand (sang, poumons, cœur, rate, foie, os, reins, muscles et intestins). Les organes sont pesés séparément et la radioactivité contenue dans chacun d'eux est déterminée à l'aide d'un gamma-compteur (COBRA II, Packard Instruments). Les

résultats sont exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme de tissus (% ID/g) ou en pourcentage de dose injectée (% ID) pour chaque organe. De même, les ratios de fixation tumeurs sur organe sont calculés.

8.2. Résultats

8.2.1. *Imagerie TEMP-TDM chez la souris xéno greffée*

L'imagerie TEMP-TDM est obtenue après administration de 18,5 MBq (≈ 1 MBq/g) de ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), 30 minutes post-injection.

Le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) injecté chez l'animal permet de localiser la tumeur U87MG utilisée comme témoin positif de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et greffée au niveau de la patte postérieure gauche de l'animal (**Figure 31, A**). La patte droite, portant la tumeur C6, témoin négatif de l'expression de $\alpha_v\beta_3$, ne montre pas de fixation visualisable du traceur. Les images reconstruites à l'aide du système FLEX SPECT™ confirment la détection correcte de tumeurs $\alpha_v\beta_3$ positives xéno greffées sur les pattes postérieures droites d'autres souris ($n = 6$). Il est par exemple possible de visualiser la tumeur mélanique B16F10 xéno greffée sur la patte postérieure droite de l'animal (**Figure 31 B**). Une bonne fixation du traceur est observée et les tumeurs sont visualisées avec un bon contraste vis-à-vis du bruit de fond environnant. Les images reconstruites témoignent également de la qualité de la détection des tumeurs grâce à ce traceur technétisé, notamment sur cet exemple d'animal xéno greffé d'une tumeur U87MG sur la patte postérieure droite (**Figure 31 C**). Une haute activité est également retrouvée au niveau de la vessie et des reins soulignant une voie d'élimination majoritairement rénale.

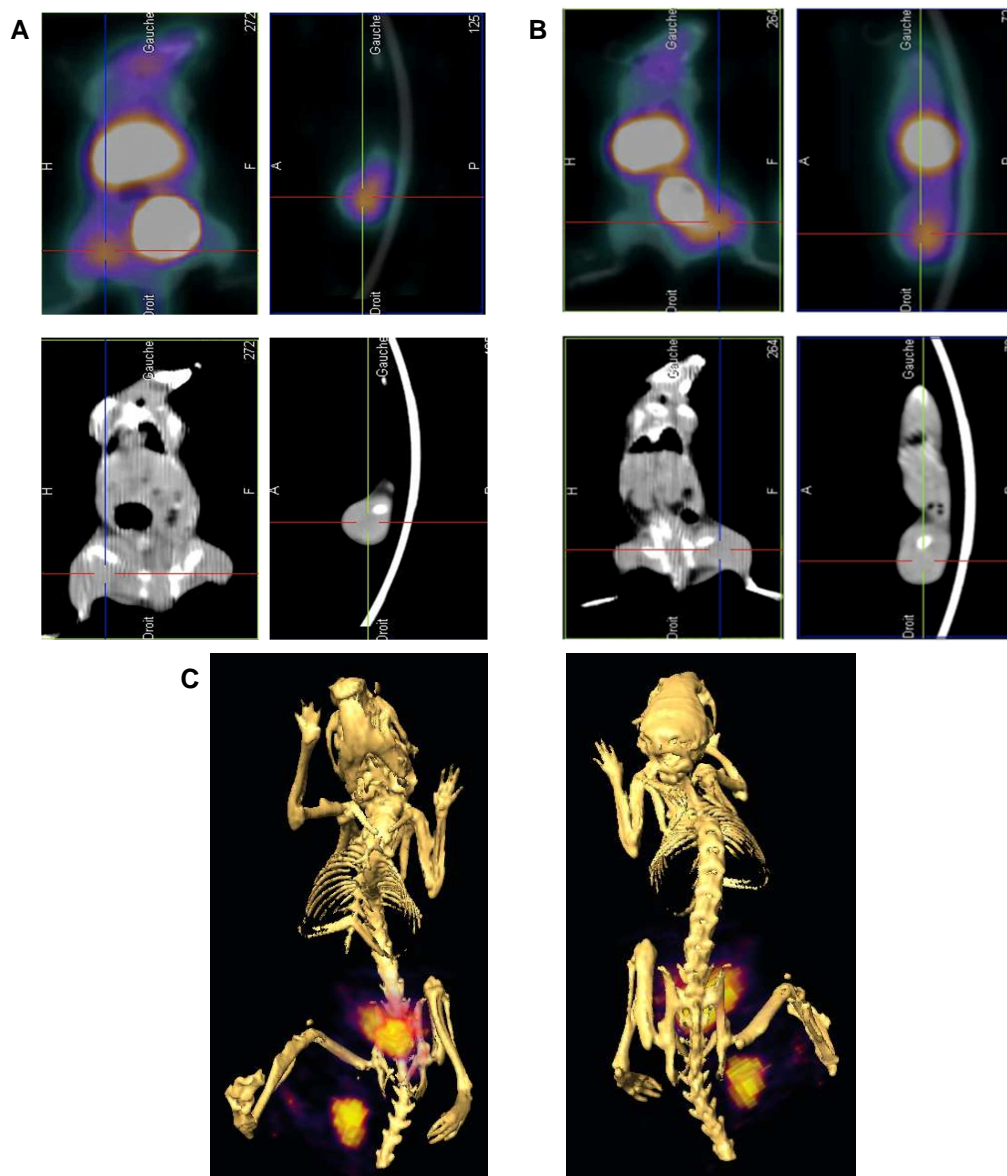


Figure 31 : Administration du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) chez la souris nude xénogreffée (n = 6) de différents types tumoraux au niveau des pattes postérieures. Images TEMP-TDM coronales et transaxiales 30 minutes p.i. (A) L'injection du traceur permet de localiser la tumeur U87MG sur la patte postérieure gauche et (B) la tumeur B16F10 sur la patte arrière droite d'un autre animal. Dans chaque situation, les tumeurs C6 xénogreffées sur les pattes controlatérales ne sont pas détectées. (C) Vues antérieures et postérieures reconstruites d'une souris xénogreffée d'une tumeur U87MG $\alpha_v\beta_3$ positive. Il est possible d'identifier la tumeur ainsi qu'une importante élimination rénale du traceur

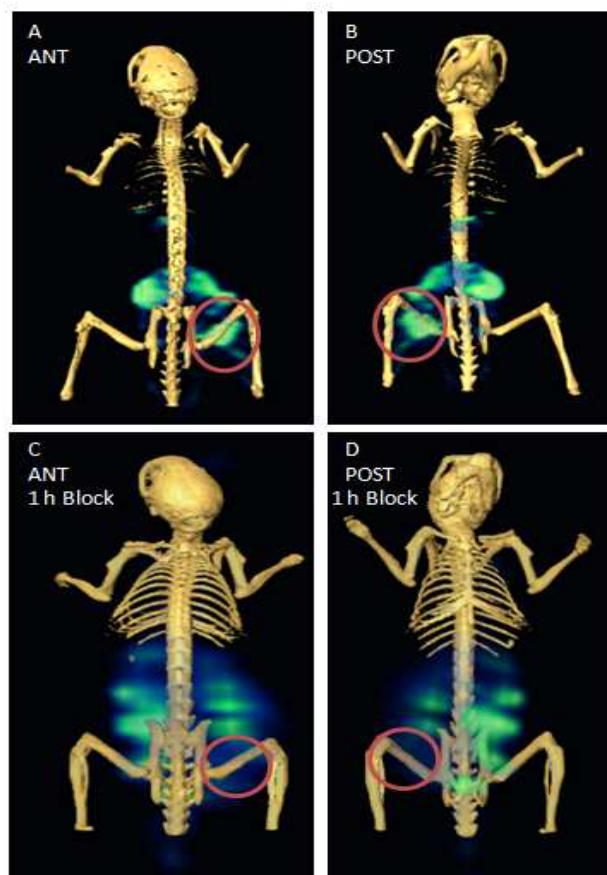


Figure 32 : Image de souris nude athymique xénogreffée de tumeur U87MG après injection de 24,2 MBq (≈ 1 MBq/g) de traceur et 1 heure de compétition à l'aide d'un excès de c(RGDfK) (101,7 μ g par kg de souris). (A & B) Scans antérieur et postérieur présentant une importante fixation tumorale (C & D) 1 heure de compétition avec le c(RGDfK) conduit au déplacement du traceur et éteint le signal de la tumeur

La spécificité de ce ciblage est confirmée par un essai de compétition *in vivo* chez l'animal. Pour cela, des souris xénogreffées de tumeurs U87MG ont été imagées (tomographie de 15 minutes) après injection de 24,2 MBq de ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), (≈ 1 MBq/g) après une heure de compétition, en présence d'un excès de compétiteur froid c(RGDfK) (facteur 300, 101,7 μ g par kg de souris, $n = 3$). Dans ces conditions, 97,9 % de la fixation du traceur est inhibée, ce qui confirme à nouveau la spécificité de l'interaction de notre traceur avec l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (**Figure 32**).

8.2.2. Etudes de biodistribution

L'étude de biodistribution du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) est réalisée chez la souris nude xénogreffée de tumeur B16F10 et U87MG, en vue d'apprécier et quantifier la répartition du radiotraceur dans l'organisme. La mise au point de la technique a été réalisée sur le modèle

mélanique. Les souris alors xénogreffées de tumeurs B16F10 (n = 10) sont sacrifiées à 1 et 2,5 heures après injection. Ces premiers tests ont été confirmés et validés sur un modèle de gliome. Les souris porteuses de tumeur U87MG sont sacrifiées et disséquées à 1, 2 et 4 heures après injection (n = 15, cinq par intervalle de temps). Les résultats sont exprimés en pourcentage de dose administrée par gramme de tissu. Chaque point représente la moyenne des données obtenues chez cinq animaux.

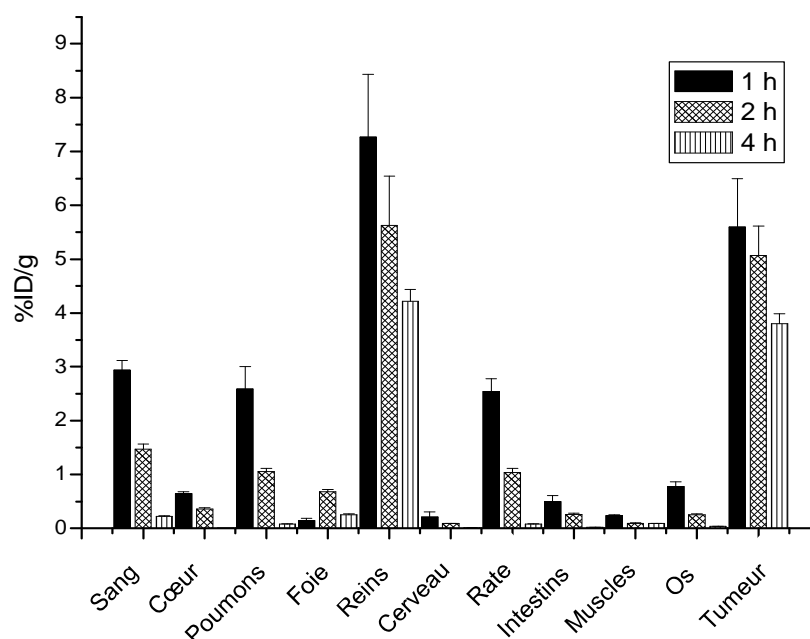


Figure 33 : Etude de biodistribution du radiotracer chez la souris nude xénogreffée de tumeur U87MG. Le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) présente une élimination majoritairement rénale. 60 minutes après injection, l'accumulation du traceur est de $7,27 \pm 1,16$ % ID/g dans les reins et de $0,14 \pm 0,04$ ID/g dans le foie

Les principales activités sont retrouvées au niveau des reins ($7,27 \pm 1,16$ % ID/g) soulignant qu'il s'agit de la voie d'élimination majoritaire du conjugué radiomarké. *A contrario*, l'activité est faible au niveau hépatique ($0,14 \pm 0,04$ % ID/g). De fortes activités sont mesurées dans la rate ($2,55 \pm 0,23$ % ID/g) et dans les poumons ($2,59 \pm 0,41$ % ID/g). Dans les tissus mous (muscles, etc), la quantité de traceur semble négligeable, et sa fixation reste relativement faible au niveau hépatique et intestinal (moins de 1,0 % ID/g, 2 heures post-injection) (**Figure 33**).

Le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) présente une accumulation importante au niveau des tumeurs $\alpha_v\beta_3$ positive, de glioblastome humaine, U87MG (5,60 % ID/g *versus* 0,23 % ID/g pour les muscles, à 60 minutes post-injection) et de mélanome murin, B16F10 (1,56 % ID/g *versus* 0,53 % ID/g pour les muscles, à 150 minutes post-injection). Les muscles sont

considérés comme témoin négatif de la fixation du dérivé RGD technétié. Les ratios de fixation tumeur/muscles sont respectivement de 24,35 et 2,92 pour les tumeurs U87MG et B16F10. Donc, même si la fixation du traceur semble limitée pour les tumeurs B16F10, le ratio de fixation spécifique de chaque tumeur en comparaison avec le bruit de fond relatif présente des valeurs significatives.

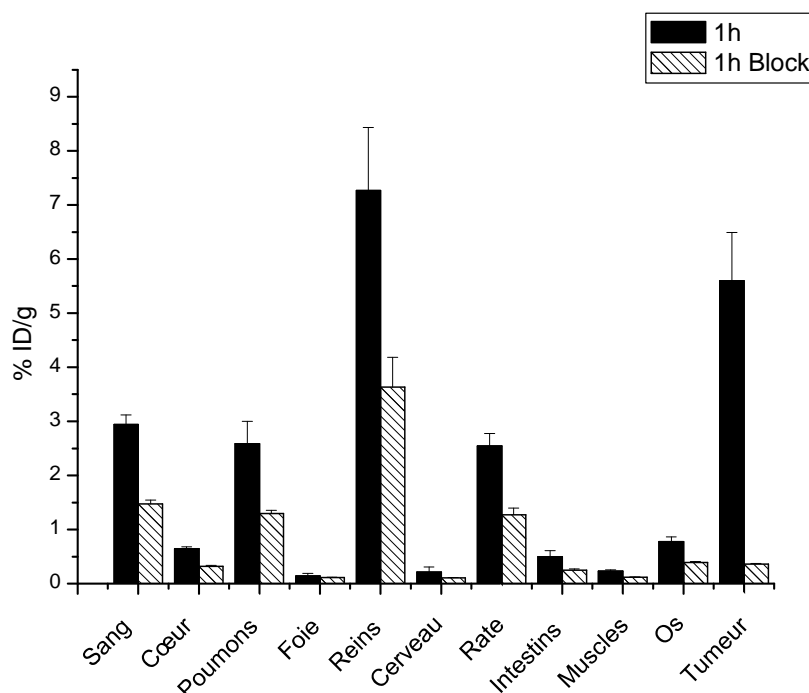


Figure 34 : Biodistribution du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) seul et en présence d'un excès de compétiteur froid, c(RGDfK) ($101,7 \mu\text{g/kg}$ de souris) sur modèle U87MG. 1 heure après injection, un blocage de la fixation de $94,01 \pm 2,1$ % est observé

La spécificité du ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est confirmée par la co-injection au radiotraceur d'un excès de compétiteur froid c(RGDfK), chez la souris xénotransplantée de tumeur U87MG, ce qui aboutit à une diminution de la fixation du radiotraceur de $94,01 \pm 2,10$ %. La fixation du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) permet donc la visualisation spécifique des régions tumorales exprimant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ en imagerie TEMP-TDM (**Figure 34**).



Cite this: *RSC Adv.*, 2015, 5, 60161

^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) a potential alpha(v) beta3 integrin based homobivalent radioligand for imaging neoangiogenesis in malignant glioma and melanoma†

Frédéric Debordeaux,^{*ab} Jürgen Schulz,^{ab} Catherine Savona-Baron,^{ab} Puja Panwar Hazari,^c Cyril Lervat,^{ab} Anil Kumar Mishra,^c Colette Ries,^{ab} Nicole Barthe,^{ef} Béatrice Vergier^d and Philippe Fernandez^{ab}

$\alpha_v\beta_3$ integrin is a marker of tumor neoangiogenesis that specifically binds to RGD containing peptides. Hence, the present study is focused on the development of ^{99m}Tc-labeled bivalent DTPA-bis-c(RGDfK) conjugate and its preclinical evaluation on human tumor cell lines expressing $\alpha_v\beta_3$ targets. Homobivalent DTPA-bis-c(RGDfK) was prepared and assessed for its affinity and specificity in $\alpha_v\beta_3$ positive (and negative) receptor cell lines. DTPA-bis-c(RGDfK) conjugate was labeled with ^{99m}Tc and subjected to cells/tissue sections. Localization of $\alpha_v\beta_3$ expression was corroborated using immunostaining and ex vivo imaging of the distribution pattern of ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK). The radiolabeling of the DTPA-bis-c(RGDfK) with ^{99m}Tc is obtained after 45 min at 95 °C with a radiochemical yield of about 45%. Radiochemical purity was >95% after C18 Oasis HLB cartridge purification with specific activity of 1475 GBq mmol⁻¹. *In vitro* experiments showed high affinity and specificity for $\alpha_v\beta_3$ with IC₅₀ of 32.86 ± 7.83 nmol L⁻¹. *Ex vivo* imaging on tissue sections confirmed preliminary specificity results. *In vivo* analysis in a mouse model showed that this tracer was able to detect and readily identify U87MG and B16F10 $\alpha_v\beta_3$ positive tumors 60 minutes post-injection. c(RGDfK) blocking experiments confirmed its excellent affinity and specificity to $\alpha_v\beta_3$ receptors in U87MG tumors. The radiotracer was mainly excreted through the renal route with minimal radioactivity being excreted through the hepatobiliary route. ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) can be an excellent scintigraphic agent for imaging of $\alpha_v\beta_3$ receptors being expressed in abundance in malignant glioma and melanoma cancer.

Received 15th May 2015

Accepted 7th July 2015

DOI: 10.1039/c5ra09119e

www.rsc.org/advances

Introduction

Angiogenesis is a key requirement to provide oxygen and nutrients for both metastasis and tumor growth. Tumor neoangiogenesis is a predictive element of the evolution of numerous cancers.^{1,2} So, the development of antiangiogenic therapeutic reinforces the interest for the imaging of neoangiogenesis. Integrins are heterodimeric transmembrane glycoproteins consisting of non-covalently associated α and β subunits, possessing the sequence arginine-glycine-aspartic

acid (RGD) through a specific recognition and playing an important role in the regulation of various intracellular signalling pathways.³ Among them, the integrin $\alpha_v\beta_3$ is highly expressed in tumors such as osteosarcomas, neuroblastomas, glioblastomas, malignant melanomas, breast, lung and prostate carcinomas but its expression is weak in most healthy organ systems. Moreover, multivalency or dimerization increases the interaction during receptor clustering after initial monovalent binding is initiated. The multivalency effect has been established previously using dimeric and tetrameric RGD peptides to enhance tumor targeting efficacy and to obtain better *in vivo* imaging results.⁴

Despite aggressive therapeutics with surgery, radiotherapy and chemotherapy, malignant gliomas remain more often fatal. Malignant glioma is among the most highly vascular of human tumors. Microvascular density is an independent prognostic factor for adult gliomas and angiogenesis represents an especially attractive target for their treatment.

For melanomas, early detection is crucial for prognosis. Anatomical imaging seems limited for precise therapeutic

^aUniv. Bordeaux, INCIA, UMR 5287, F-33400 Talence, France. E-mail: frederic.debordeaux@chu-bordeaux.fr

^bCNRS, INCIA, UMR 5287, F-33400 Talence, France

^cDivision of Cyclotron and Radiopharmaceutical Sciences, Institute of Nuclear Medicine and Allied Sciences, DRDO, New Delhi, India 110052

^dCHU de Bordeaux, Service d'anatomopathologie, F-33000 Bordeaux, France

^eUniv. Bordeaux, Bioingénierie tissulaire, U1026, F-33000 Bordeaux, France

^fINSERM, Bioingénierie tissulaire, U1026, F-33000 Bordeaux, France

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c5ra09119e

answer. The pattern of melanoma is often unpredictable, and conventional imaging provides limited value for accurate staging and quantification of the disease burden. Given these limitations, a new imaging tool allowing the early diagnosis of metastatic disease either at the level of nodal or distant organs seems essential.

It has been proven that cyclization of the RGD sequence not only results in increased selectivity and affinity with better targeting capability, but also in higher cellular uptake through the integrin dependent endocytosis pathway and better resistance to the action of serum proteases. As dimeric peptides offered good tumor selectivity and good T/B ratios,^{5–10} and as DTPA (diethylene triamine penta acetic acid) showed excellent complexation results with ^{99m}Tc for medical imaging, a new dimeric ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) tracer has been developed in our laboratory.

The objective of this study is to establish a new bifunctional dimeric c(RGDfK) probe to evaluate neoangiogenesis in glioma and melanoma cell lines using *ex vivo* and *in vivo* imaging. ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) structure presents a chelator, which is necessary for ^{99m}Tc-labeling and two cyclic RGD peptide motifs in order to contribute to multiple binding and high local concentration of the tracer at target site. We intend to exemplify this ^{99m}Tc tracer on highly neovascularized tumoral models: malignant melanoma and glioma for which angiogenesis is fundamental in tumor growth, invasiveness and metastasis.

Results

Solid-phase receptor binding assay

This assay helped us to estimate the value of inhibitory concentration 50 (IC₅₀). Radiolabeled echistatin was added to the cells in the presence of competitors. Non-specific binding was determined in presence of an excess of echistatin (1000 fold molar

excess). Each point was the average of triplicate data points and the results were representative of three experiments (Fig. 1A).

The labeled peptide and positive controls inhibited the binding of ¹²⁵I-echistatin to $\alpha_v\beta_3$ integrin in a dose-dependent manner. The IC₅₀ values obtained for echistatin, DTPA-bis-c(RGDfK), and c(RGDfK) were respectively 0.79 ± 0.29 nmol L⁻¹, 32.86 ± 7.83 nmol L⁻¹, and 46.83 ± 14.74 nmol L⁻¹. Competition experiments with c(RADfK) showed no inhibition of ¹²⁵I-echistatin binding, even at the highest concentration tested. ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) displayed high affinity for the $\alpha_v\beta_3$ receptors. Cell binding assays on U87MG was also performed. K_d value was 1.72 ± 0.12 nmol L⁻¹ and confirmed the high affinity of the tracer for $\alpha_v\beta_3$ integrin (Fig. 1B).

Immunocytochemical, cytotoxicity and immunohistochemical analysis

Immunocytochemical studies were performed to characterize the $\alpha_v\beta_3$ expression on the cell lines used in the present study. Non-specific binding has been evaluated in similar conditions but without the use of the primary antibody LM609. C6 cells were also confirmed as negative control, and U87MG as positive one with numerous membrane binding.

SKMEL28 cells presented lots of membranous clusters in particular in expansion area testifying the presence of the integrin $\alpha_v\beta_3$ in the plates of anchoring.

Fluorescent heap specific for $\alpha_v\beta_3$ was identified for B16F10 cells (data not shown).

Integrin expression of our cells was confirmed by flow cytometric analysis in a Becton Dickinson FACSCanto II flow cytometer (San Jose, California).

DTPA-bis-c(RGDfK) was evaluated for its ability to induce cytotoxicity on the U87MG and HEK cell lines using a methyl-thiazole tetrazolium (MTT) assay (see ESI† for experimental procedure).

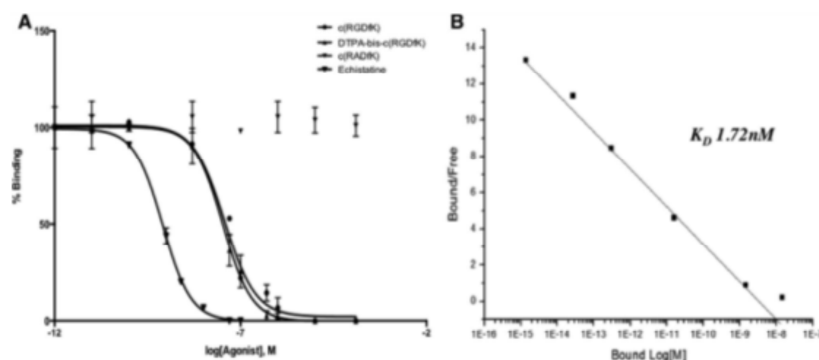


Fig. 1 (A) Displacement experiments using increasing concentrations of unlabeled DTPA-bis-c(RGDfK). Each point was the average of triplicate data points and the results shown were representative of three experiments. The best IC₅₀ value was obtained for echistatin with 0.79 ± 0.29 nmol L⁻¹. The IC₅₀ results were 32.86 ± 7.83 nmol L⁻¹, and 46.83 ± 14.74 nmol L⁻¹ for DTPA-bis-c(RGDfK), and c(RGDfK) respectively. c(RADfK) was used as negative control. (B) Binding assays on U87MG cells using increasing concentrations of ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK). The K_d results were 1.72 ± 0.12 nmol L⁻¹ for ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK).

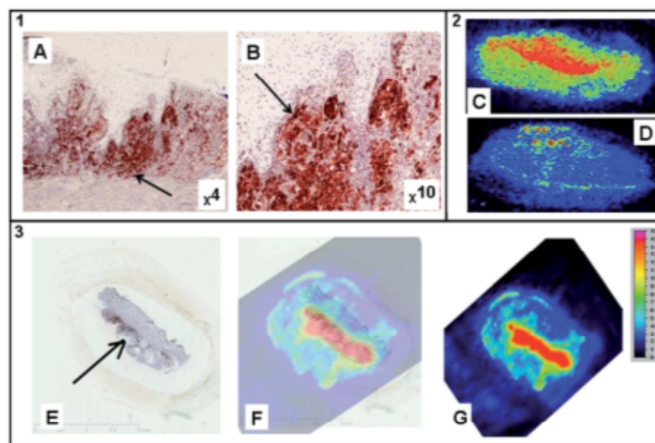


Fig. 2 (1A) Immunostaining using anti- $\alpha_v\beta_3$ human murine monoclonal antibody (LM609). Localization of high integrin expression in SS melanoma (red color) and (B) zoom of SS melanoma immunostaining. (2C) Radiolabeling of tissue section of SS melanoma with ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK). (D) Displacement study of ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) on tissue sections of SS melanoma in the presence of an excess of cold ligand c(RGDfK). (3) Comparison of the results obtained by radiolabeling with ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) and by immunostaining. (E) Immunostaining of SS melanoma using anti- $\alpha_v\beta_3$ human murine monoclonal antibody (LM609). (F) Merged images. (G) Radiolabeling with ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK).

The cells exposed to DTPA-bis-pharmacophore conjugate showed concentration-dependent cell death that was statistically significant above 1 mM. The IC_{50} values of the tracer were 0.81 ± 0.03 mM for U87MG cells (data not shown) and 1.02 ± 0.03 mM for HEK cells (Fig. S1 in ESI†).

The tested concentration of the radiolabeled conjugate was $0.68 \mu\text{M}$ and hence with an IC_{50} value of 1.02 mM, the

synthesized conjugate can be considered as a nontoxic and safe diagnostic agent.

Different tissues were tested concerning the expression of the integrin $\alpha_v\beta_3$. Naevus, and healthy brain, $\alpha_v\beta_3$ negative controls, did not show binding of the antibody LM609, which indicated the absence of overexpression of the integrin $\alpha_v\beta_3$. Superficial spreading melanoma (SS melanoma), $\alpha_v\beta_3$ positive

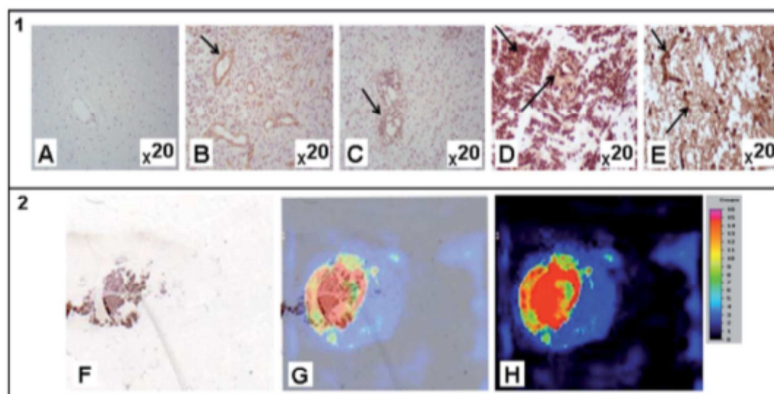


Fig. 3 (1A) Immunostaining using anti- $\alpha_v\beta_3$ human murine monoclonal antibody (LM609). Localization of high integrin expression in respectively (A) negative control (healthy brain), (B) adult glioblastoma, (C) pilocytic astrocytoma of the child, (D) anaplastic astrocytoma of the child and (E) glioblastoma of the child. (2) Comparison of the results obtained by radiolabeling with ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) and by immunostaining of anaplastic astrocytoma. (F) Immunostaining of anaplastic astrocytoma with anti- $\alpha_v\beta_3$ human murine monoclonal antibody (LM609). (G) Merged images. (H) Radiolabeling with ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK).

tumor, showed an important uptake at the level of junction area between dermis and epidermis (Fig. 2). Considering brain tumors, the expression of $\alpha_v\beta_3$ seemed to increase with the grade of the tumor. Localization, which was restricted in endothelial cells for low-grade tumors (Fig. 3C), was more largely present for high-grade tumor with both endothelial cells and tumor cells expressions (Fig. 3D and E).

^{99m}Tc labeling, purification, log *P* and stability

The initial radiochemical yield was optimized and the desired radiolabeling of DTPA-bis-c(RGDfK) with ^{99m}Tc was realized. Various quantities and different reducing agent were tested and the best results were obtained when 390 μ g of precursor DTPA-bis-c(RGDfK) and 50 μ g of SnCl₂ as reducing agent were used.

The radiochemical purity was > 95% with specific activity of 1475 GBq mmol⁻¹, and the non-decay corrected radiochemical yield was about 45% (*n* = 10). HPLC results showed a retention time for the ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) of 6.2 min. Reduced technetium was the main radiochemical impurity.

^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) presented hydrophilic properties characterized by a log *P* value of -1.78 (*n* = 3).

Stability studies under *in vitro* conditions revealed the high stability of the complex prepared. The radiochemical purity was unchanged over a period of 3 hours (0, 30, 60, 120 and 180 min) and the percentage of remaining ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) was calculated with a mean value of 95 \pm 3.0%. No significant release of technetium or peptide degradation was observed over a 3 h period.

Time course and kinetics of transport of ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK)

At first, the binding ability of the radiotracer was estimated on four cell lines (C6, B16F10, SKMEL28, U87MG).

The cell binding studies were carried out as a function of peptide concentrations and incubation times. The radiolabeled peptide radioactivity of 1.0 MBq mL⁻¹ used in the present study provided a reasonable balance between the cell binding and background signal. The variance analysis (ANOVA test) of the results for the different cell lines showed a significant difference (*p* < 0.0001) for time and time/concentration parameters. A significant difference (*p* < 0.05) was also observed according to the time/cell line type parameter.

The binding of the tracer underlined the existence of a plateau, which can be obtained after 90 min of incubation for both melanoma and glioma cells (Fig. S2 in ESI†).

Radiolabeling of tumor tissue sections

The radiolabeling of the slices of melanoma and glioma tended to confirm the results previously obtained in immunostaining. Micro-imager analysis showed an adequacy with the interaction of the LM609 monoclonal antibody. The merger of the obtained images revealed a good co-localization on samples of SS melanoma and anaplastic astrocytoma between the binding of the anti- $\alpha_v\beta_3$ antibody and the labeling of the tracer. Displacement study realized on glioma and melanoma confirmed previous results with a very low signal of the radiotracer (Fig. 2 and 3).

SPECT-CT imaging of tumor bearing mice

The Fig. 4 illustrates the selected SPECT-CT (Single Photon Emission Computed Tomography) images of tumor bearing mice administered with 18.5 MBq of ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK), at 30 min post-injection. ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) injected to the animal allowed localization of the U87MG tumor used here as a positive control of the expression of the integrin $\alpha_v\beta_3$ and grafted at the level of the right posterior leg of the animal (Fig. 4B).

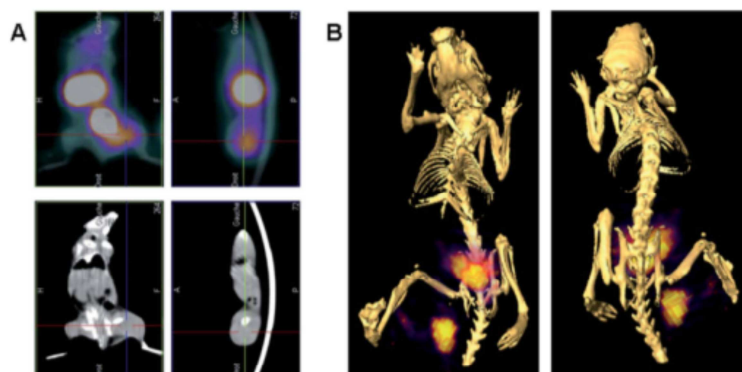


Fig. 4 Administration of the ^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) activity in nude xenografted mouse, SPECT-CT coronal and transaxial images, 30 min p.i. (A) The tracer was injected in nude mice (*n* = 6) each possessing a different tumoral type xenografted on posterior legs. The injection of the ^{99m}Tc radiolabeled peptide allowed the localization of the B16F10 tumor on the right leg. A clearly hot spot was observed compared to the background. Additional high activity was found in the bladder and kidney indicating predominant renal excretion. (B) Anterior and posterior views from reconstructed images of mice bearing U87MG $\alpha_v\beta_3$ -positive tumor. It was possible to clearly identify the tumor and an important renal excretion pathway.

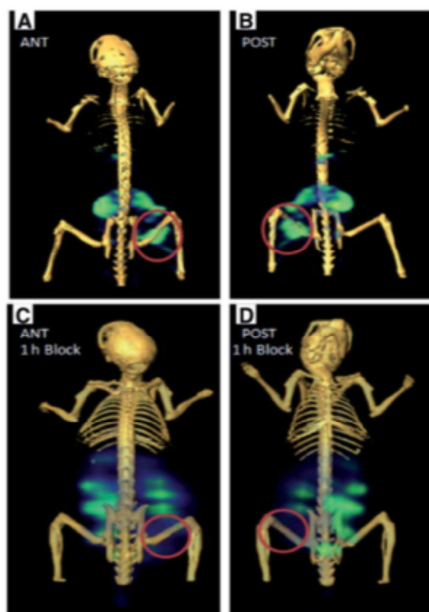


Fig. 5 Athymic nude mice bearing U87MG tumors were scanned (15 min tomography) after the injection of 24.2 MBq with 1 h block using ~ 300 fold excess of native c(RGDfK) ($101.7 \mu\text{g per kg per mice}$). (A & B) Anterior and posterior scan with remarkable uptake at tumor site. (C & D) Represent 1 h block with c(RGDfK) clearly showing displacement of the radiotracer from the tumor site.

The left leg carrying the C6 tumor, negative control of the expression of the integrin $\alpha_v\beta_3$, did not show viewable binding of the tracer. The reconstructed images obtained with FLEX SPECT TM confirmed readily observation of $\alpha_v\beta_3$ positive tumor on right posterior leg of another animal. The third mouse was characterized by the presence of melanocytic tumor B16F10 on posterior leg (Fig. 4A). A good binding of the radiotracer was observed and tumors stood out with a good contrast compared with surrounding tissues. Receptor specificity was confirmed by blocking experiments.

For the c(RGDfK) blocking experiments, mice bearing U87MG tumors were scanned (15 min tomography) after the injection of 24.2 MBq with 1 h block using ~ 300 fold excess of native c(RGDfK) ($101.7 \mu\text{g per kg per mice}$). 97.88% block was observed confirming the receptor specificity at the target site (Fig. 5).

Biodistribution studies

Biodistribution study of the $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-bis-c(RGDfK) was performed in nude mice bearing B16F10 and U87MG tumors in order to quantify localization of the radiolabeled peptide. U87MG xenografted nude mice were sacrificed and dissected ($n = 15$, 5 per time interval) at 1, 2, and 4 h p.i. B16F10 xenografted nude mice were sacrificed ($n = 10$) at 1 h and 2.5 h. The results (Fig. 6) were expressed in percentage of the dose administered per gram of tissue. Each data point represented an average of 5 animals. The main activities were found at the level of the urinary tract in the kidney ($7.27 \pm 1.16\%$ ID per g) showing that renal routes mainly excreted the complex. Strong activities were found in spleen ($2.55 \pm 0.23\%$ ID per g) and in lungs ($2.59 \pm 0.41\%$ ID per g). Soft tissues (muscles) accumulated negligible quantities of the tracer and localization of the radioactivity in the liver and intestine was low (less than 1.0% ID per g at 2 h post-injection) (Fig. 6).

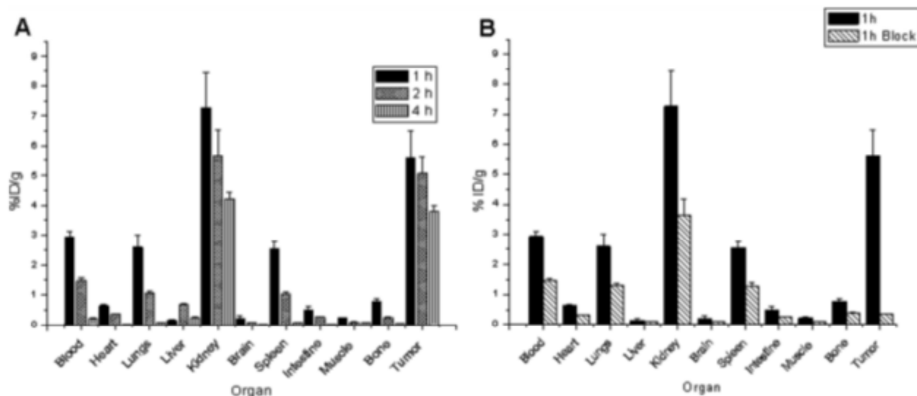


Fig. 6 Biodistribution study in U87MG xenografted mice. (A) $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-bis-c(RGDfK) showed mainly renal excretion. Post-injection accumulation 60 min was $7.27 \pm 1.16\%$ ID per g in kidney and $0.14 \pm 0.04\%$ ID per g in liver. (B) Comparison of biodistribution with co-injection of blocking dose of c(RGDfK) ($101.7 \mu\text{g per kg per mice}$) and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-bis-c(RGDfK). 94.01 \pm 2.1% block was observed.

The radiolabeled peptide displayed high accumulation in the $\alpha_v\beta_3$ positive tumors, U87MG human glioblastoma (5.60% ID per g *versus* 0.23% ID per g for the muscle at 60 min p.i.) and the B16F10 murine melanoma (1.56% ID per g *versus* 0.53% ID per g for the muscle at 150 min p.i., data not shown). Muscles were considered as negative control. The tumor/muscle ratios were 24.35 and 2.92 for U87MG and B16F10 tumors respectively. So, even if tumor binding seemed to be limited for B16F10, the ratio of specific binding compared to the background showed, for each type of tumor, significant values. The specific binding of the ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) on U87MG was further supported by the co-injection of the blocking dose of c(RGDfK), where $94.01 \pm 2.1\%$ block was observed. These values indicated both specificity and retention.

Localization of the positive control, U87MG tumor, was possible and murine melanoma tumor B16F10 could be readily identified. Moreover, these comparative studies pointed out the predominant renal excretion pathway.

Discussion

Malignant glioma is one of the most aggressive primary brain tumor with poor survival rates and universal recurrence despite aggressive treatments.^{11,12}

Melanoma diagnosis is mainly clinical and techniques used for diagnosis and staging lack specificity with relatively high false-positive rate and with a low sensitivity for the detection of occult regional nodal metastases. Early detection is crucial, so new tracers have to be developed in order to get an early information and diagnosis.^{13–17}

In this respect, radiolabeled RGD peptides used for non-invasive molecular imaging of $\alpha_v\beta_3$ integrin expression are interesting tools for early detection and treatment of rapidly growing tumors. The concept of bivalency has been applied to develop ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), a dimeric RGD peptide, in order to improve tumor targeting compared to the corresponding monomeric RGD peptide analog. The DTPA was chosen for its two potential reactive sites starting from bis-anhydride. In fact, conjugation of RGD peptide is possible *via* the formation of an amide bond between the ε -amine of lysine and the anhydride function. This structure allows also the formation of complex with only one chelate per metal atom, which is required for *in vivo* stability and biological activity. Moreover, ^{99m}Tc -labeled derivatives should be more widely available and clinically applicable.

In vitro binding specificity of DTPA-bis-c(RGDfK) to the $\alpha_v\beta_3$ integrin was demonstrated by the binding inhibition of echistatin to cells and coated receptors. Binding assays gave us value that agreed closely with IC_{50} value of echistatin in the literature and displayed high affinity of our RGD peptide for $\alpha_v\beta_3$ integrin with also excellent K_d values.¹⁸ The results obtained with our tracer were better than those of the positive control c(RGDfK). The binding of echistatin was competed by cyclic RGD peptides whereas no competition was observed with a cyclic peptide containing RAD sequence, confirming the implication of the RGD sequence in the binding of echistatin to $\alpha_v\beta_3$.¹⁹

Concerning affinity determination of the peptide, different parameters have to be taken into account. First of all, tumor targeting and binding experiments are dependent on the integrin $\alpha_v\beta_3$ quantity on tumor cells, tumor neovasculature and on the binding medium. Some experiments showed higher values for cyclic RGD peptides with entire cell than with purified receptors. So, it's not possible to completely exclude that RGD peptides may non-specifically bind to other integrins. These experiments depicted high affinity and specificity of our radio-tracer for $\alpha_v\beta_3$ integrin.^{2,11,18}

To ease the interpretation of the *in vivo* and *in vitro* experiments, $\alpha_v\beta_3$ expression was evaluated in tumor and cells, in order to link our radiolabeling results to the $\alpha_v\beta_3$ expression level of the target. The use of positive or negative control for cells and tissue section experiments demonstrated the specificity of our tracer for $\alpha_v\beta_3$ integrin. Co-localization of the LM609 monoclonal antibody, and ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), as well as displacement studies with an excess of cold c(RGDfK), confirmed the specificity of the labeling. To optimize these results, an incubation time of 90 min was chosen for the labeling to get an equilibrium state (Fig. S2 in ESI†).

$\log P$ result was in accordance with the retention time obtained in HPLC and underlined hydrophilic properties but lower than those of the reference, ^{99m}Tc -HYNIC-RGD ($\log P = -3.5$).²⁰

SPECT images confirmed high uptake in $\alpha_v\beta_3$ receptor positive tumor and low uptake in negative tumor xenografts, thus demonstrating specific receptor mediated uptake *in vivo*. The tumor was clearly visualized by SPECT/CT with good contrast. Then, considering $\alpha_v\beta_3$ expression, it is not surprising to see a high uptake in lungs of tumor bearing mice.^{21,22} The high specificity and selectivity of the results in uptake and distribution were confirmed in animal models with and without co-administration of blocking dose.

Because of a wide variety of linkers and chelators for ^{99m}Tc , establishing a comparison among radiolabeled RGD tracers is difficult. Nevertheless, we can notice that tumor uptake of ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) is comparable with the results of c(RGDfK)-(Orn)₃-[CGG- ^{99m}Tc] ($3.32 \pm 0.09\%$ ID per g at 30 min p.i.) or of ^{99m}Tc -AuNP-RGD ($3.65 \pm 0.19\%$ ID per g at 60 min p.i.), and relatively high in comparison to ^{99m}Tc -PGC-c(RGDyK) with tumor uptake of $1.38 \pm 0.30\%$ ID per g at 120 min p.i. or ^{99m}Tc -DKCK-RGD (1.1% ID per g in melanoma, 2.2% ID per g in osteosarcoma, at 240 min p.i.).^{23–26}

As shown by biodistribution studies, radiolabeled cyclic RGD monomers may be useful for imaging integrin $\alpha_v\beta_3$ expression in tumors, but pharmacokinetics optimization is required for clinical utility because of their relatively low tumor uptake and partial hepatobiliary excretion. To improve the $\alpha_v\beta_3$ binding affinity and pharmacokinetics, multimerization has been developed, and different linkers have been incorporated such as sugar moiety to increase excretion *via* the renal pathway.^{5,6}

Both small size of the peptide and hydrophilic properties could explain the pharmacokinetics profile of our dimeric peptide. Kidney were mainly concerned for the excretion of ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK).

Plasma protein binding and lipophilicity varied significantly between different radiolabeled conjugates, leading to considerable differences in pharmacokinetic profiles as well as in tumor uptake (0.2–2.7% ID per g). Nevertheless, other RGD derivatives, such as ^{99m}Tc -EDDA-HYNIC-RGD, c(RGDfK)-(Orn)₃-[CGG- ^{99m}Tc], ^{99m}Tc O(MAG₂-3G₃-dimer), or ^{99m}Tc -RAFT-RGD, have presented similar elimination pathway with a main excretion *via* the renal pathway and to a lesser degree the hepatobiliary route.^{20,23,27,28}

The fast radiotracer washout observed from normal organs was linked to integrin density. Early imaging was facilitated due to this rapid reduction in background radioactivity. But at later time points, imaging may be improved thanks to further reduction in background noise from the surrounding tissues.²⁶

Experimental

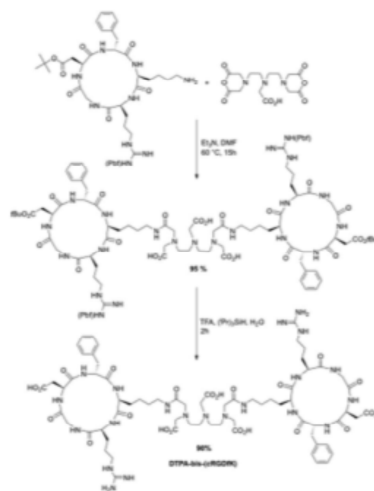
Synthesis and purification of DTPA-bis-c(RGDfK)

The linear peptide (RGDfK) was synthesized by solid-phase synthesis onto a Liberty 1 (CEM) microwave peptide synthesizer using a trityl chloride resin (TCP resin, Sigma-Aldrich), applying the standard 9-fluorenylmethyloxycarbonyl (Fmoc) strategy.^{29,30} The final Fmoc protecting group was removed with 20% solution of piperidine in DMF. The next steps (cleavage from the resin, cyclization and removal of the Z protecting group) were successfully carried out as described by Haubner *et al.*³⁰

The synthesis of DTPA-bis-c(RGDfK) was carried out using the strategy described by Hazari *et al.* (Scheme 1).^{31,32} DTPA dianhydride (9 mg, 25 μmol , Sigma-Aldrich) and protected c(RGDfK) (46 mg, 50 μmol) were dissolved in 20 mL of anhydrous DMF. Triethylamine (28 μL , 0.2 mmol, Sigma-Aldrich) was then added and the reaction was allowed to proceed for 15 h at 60 °C. Solvents were removed under reduced pressure and the conjugate was precipitated with diethyl ether. Deprotections of Pbf (2,2,4,6,7-pentamethyl-2H-benzofuran-5-sulfonyl) and *tert*-butyl protecting groups were achieved by treatment of the protected adduct in 20 mL of TFA/(iPr)₃SiH/H₂O (92/4/4) at room temperature for 2 h. The DTPA-bis-c(RGDfK) conjugate (33 mg, 21 μmol) was then precipitated and washed with cold diethyl ether. Matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) time-of-flight (TOF) mass spectrometry (MS) (Fig. S3 in ESI†) was performed on a Voyager mass spectrometer (Applied Biosystems) equipped with a pulsed N₂ laser (337 nm) and a time-delayed extracted ion source. MALDI-TOF-MS: $[M + H]^+ = 1564.6$ (1564.8 Da calculated for C₆₈H₁₀₂N₂₁O₂₂). HPLC was performed onto the protected DTPA-bis-c(R(Pbf)GDfK) and the deprotected DTPA-bis-c(RGDfK) (Fig. S4 and S5 in ESI†). The column was a Luna C18 (250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm). The flow rate was 1 mL min⁻¹ with mobile phase starting from NH₄OH 50 mM/MeOH (95/5), followed by a linear gradient over 30 min to NH₄OH 50 mM/MeOH (5/95).

Solid-phase receptor binding assay

In vitro affinity and specificity of DTPA-bis-c(RGDfK) were assessed *via* binding assays using ^{125}I -echistatin (Perkin Elmer) as the



Scheme 1 Synthetic pathway for DTPA-bis-c(RGDfK).

integrin $\alpha_v\beta_3$ specific radioligand and unlabeled echistatin (Sigma-Aldrich) as reference, by modification of a previously described method.³³ Moreover, c(RGDfK) and c(RADfK) purchased from GeneCust (Dudelange, Luxembourg) were tested as competitor and negative control respectively. Briefly, human integrin $\alpha_v\beta_3$ (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) was diluted at 20 ng mL⁻¹ in coating buffer (20 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂). An aliquot of 100 μL per well was added to a Millipore 96-well multiscreen IP filter plates (pore size 0.45 μm) and incubated overnight at 4 °C. The plate was washed once with blocking/binding buffer (50 mM Tris, pH 7.4, 100 mM NaCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 1% bovine serum albumin), and incubated an additional 2 h at room temperature with 150 μL per well of blocking/binding buffer. The plate was then rinsed twice with the same buffer and incubated for 3 h at room temperature with shaking with ^{125}I -echistatin (30 pM per well, volume activity 2500 Bq mL⁻¹, 500 Bq per well) in presence of increasing concentrations of each competitor (0–100 $\mu\text{mol L}^{-1}$). The total volume in each well was adjusted to 200 μL . The plates were filtered through a multiscreen vacuum manifold and unbound radioligand was removed by three additional washes. The filters were collected and the radioactivity was evaluated using a γ -counter (Packard COBRA II, Packard Instruments). Non-specific binding was determined in presence of an excess of echistatin (1000 fold molar excess) and was subtracted from the total binding to yield specific binding. When ^{125}I -ligand incubations were performed without receptor, no interaction was detected due to non-specific adsorption onto the microliter well. Each point was the average of triplicate data points and the results were representative of three experiments. The best-fit 50% inhibitory concentration (IC₅₀) values were calculated by fitting inhibition values by non-linear regression using GraphPad Prism (GraphPad

Software, Inc.). To confirm the results, binding study was also performed on U87MG cells using increasing concentrations of ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) (see ESI† for experimental procedure).

Immunohistochemical analysis

Different $\alpha_v\beta_3$ positive and negative tumors were formalin-fixed and paraffin-embedded. Immunohistochemical integrin $\alpha_v\beta_3$ detection was performed on serial sections in order to validate radiolabeling analysis. Appropriate positive and negative controls omitting the primary antibody were included with every slide run.

Paraffin embedded 5 μm thick sections were deparaffinized with xylene, rehydrated through a graded alcohol series, and washed with distilled water. A blocking step was needed in order to block endogenous peroxidase activity. After washing with PBS, the slides were saturated with BSA 0.2% in PBS 0.01 M for 30 min, then incubated with the primary antibody (LM609, 1 : 200) in humidified atmosphere (12 h, 4 °C). Sections were washed twice with PBS, and the secondary biotinylated antibody (goat anti-mouse antibody, EnVision™ MultiLink, Dako) was applied in moist chamber for 1 hour. Tissue sections were stained with AEC (3-Amino-9-EthylCarbazole, ab 64252, Abcam, Cambridge) for 10 min and counterstained with hematoxylin for examination.

^{99m}Tc radiolabeling

DTPA-bis-c(RGDfK) was synthesized in our laboratory and $[\text{Na}^{99m}\text{TcO}_4^-]$ was obtained from a commercial $^{99}\text{Mo}/^{99m}\text{Tc}$ generator (Elumatic III, IBA international, France).

In a rubber-sealed vial, 1.56 mg (1 μmol) of DTPA-bis-c(RGDfK) was dissolved into 200 μL of water to form a stock solution. Then 50 μL of this solution (390 μg of DTPA-bis-c(RGDfK)) were transferred into a leaded shielded vial along with 100 μL of tin(II) solution in 10% acetic acid ($\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.5 mg mL^{-1}). 500 μL of $^{99m}\text{TcO}_4^-$ (360 MBq) were then added and pH was adjusted at 7 by addition of Na_2CO_3 (0.1 M, 900 μL). This final solution was then heated for 45 min at 95 °C.

After cooling, the complex was purified using a C18 Oasis HLB cartridge (Waters, Taunton, USA), preliminarily activated with 5 mL of ethanol and 20 mL of water. The cartridge was loaded with the reaction mixture and then washed with 10 mL of water. The purified tracer was eluted with 2 mL of ethanol. Solvents were removed by heating at 80 °C for 5 min and applying a gentle stream of nitrogen. ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) (165 MBq) was finally diluted with saline (NaCl 0.9%) for injection.

Radiochemical purity was determined by thin layer radiochromatography (ITLC-SG type sheet, Pall Corporation) using acetone or acetone/NaCl 0.9% (1/1) as eluent. In acetone $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migrated in front of solvent while reduced/hydrolysed ^{99m}Tc and ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) did not migrate. On the other hand with acetone/NaCl 0.9% (1/1) the complex migrated with a R_f of 0.9 while ^{99m}Tc colloids remained at the origin. Radiochemical purity was determined after integration of each peak. Radiochemical purity was determined with following

formula: $100\% - (\% \text{ of hydrolysed technetium} + \% \text{ of free technetium})$.

The chemical purity was also checked by analytical HPLC (Luna column C18 (250 mm \times 4.6 mm \times 5 μm), $\text{CH}_3\text{CN}/\text{NH}_4\text{OH}$ 0.2% (40/60), 0.5 mL min^{-1}), $R_t = 6.0$ –6.3 min.

log P values

log P value of ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) was determined as described previously.²⁰ Briefly, ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) in PBS was added to 0.5 mL of octanol in an Eppendorf vial. The tube was vigorously vortexed and centrifuged at $5000 \times g$ for 3 min. Aliquot of both aqueous and octanol layers were collected and counted in a γ -counter. log P values were then calculated ($\log P = [(\text{octanol layer activity})/(\text{aqueous layer activity})]$).

Radiochemical stability

The stability of the labeled compound was evaluated using ascending thin layer chromatography on ITLC-SG strips and a Raytest miniGITA radiochromatograph (Wilmington USA) using NaCl 0.9%/acetone (1/1) as eluent. The stability of the radiolabeled conjugate was evaluated at 30, 60, 120 and 180 min at which the percentage of remaining ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) was calculated.

Cell cultures

Murine melanoma cell line (B16F10, $\alpha_v\beta_3$ positive) from C57Bl/6 mice (ATCC reference # CRL-6322) were cultured in DMEM medium with 4.5 g of glucose supplemented with 10% FCS, 1% glutamine (GlutaMAX™, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 100 UI mL^{-1} penicillin and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin.

Human melanoma cell line (SKMEL28, $\alpha_v\beta_3$ positive) was obtained from a malignant melanoma of a 51 years old man. Cells were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% FCS, 1% glutamine (GlutaMAX™, Invitrogen, Cergy Pontoise, France), 100 UI mL^{-1} penicillin and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin.

Human adult glioblastoma cells (U87MG, $\alpha_v\beta_3$ positive) derived from malignant glioma, were cultured in DMEM medium supplemented with 10% FCS, 100 UI mL^{-1} penicillin and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin.

Rat glioma cell line (C6, $\alpha_v\beta_3$ negative) was cloned from a rat glial tumor induced by *N*-nitrosomethylurea (ATCC reference # CCL-107). Cells were cultured in DMEM medium supplemented with 5% FCS, 100 UI mL^{-1} penicillin and 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ streptomycin.

The cells were maintained at 37 °C in humidified atmosphere of 5% CO_2 and 95% air. Cells were grown in culture until 80% of confluence. Cells were harvested and suspended in binding buffer (culture medium with 0.1% Bovine Serum Albumin (BSA), Hepes 20 mM pH 7.4).

Time course and kinetics of transport of ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK)

Cells were incubated with binding buffer for 45 min. This medium was then removed and replaced by 100 μL of cells

suspension (100 000 cells per well). Cells were incubated for different times (15 min to 180 min) at 37 °C in triplicate with either ^{99m}Tc -labeled peptide in binding buffer (100 μL , volume activity 1 MBq mL^{-1} , total series) or 20 μM echistatin and ^{99m}Tc -labeled peptide in binding buffer (100 μL , non-specific series).

Incubation was interrupted by aspiration, removal of medium and rapid rinsing twice with ice-cold PBS (200 μL). Furthermore, cell radioactivity was measured with a γ -counter. The results were decay corrected and fitted to 2 million cells by well.

Ex vivo imaging: radiolabeling of tumor tissue sections

As for immunohistochemical analysis, tumor sections were studied. 5 μm thick slices were deparaffinized and prepared as previously described.

Then, ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) was added (296 kBq/40 μL) and slices were incubated at room temperature for 60 min. Unbound radioligand was removed with PBS-Tween 0.05% and slices were washed in distilled water. Radioactivity was finally evaluated using a micro-imager 2000 (Biospace Lab, Paris). To ensure specific binding, displacement studies were performed using c(RGDfK) (40 μL , 1 mM) which was applied for 90 min after radiolabeled peptide exposure.

In vivo evaluation of radiolabeled peptides

All animal experiments were performed in accordance with the European Community Standards on the Care and Use of Laboratory Animals and approved by the Animal Ethics Committee of our University and also in accordance with the protocol approved by INMAS Institutional Animal Ethics Committee (CPCSEA Regn no. 8/GO/a/99). All animals were bred and housed under pathogen free conditions and provided water and food *ad libitum*.

Different type of tumor models were used for the *in vivo* biodistribution and imaging studies. C6 tumor cells were used as negative control and U87MG as positive control of integrin expression.

The cells were centrifuged (5 min, 200 $\times g$) and the pellet was suspended in sterile NaCl 0.9% for extemporaneous administration to the animal.

Tumor uptake studies were performed in female nu/nu mice (Charles River, L'Arbresle, France) and different models were tested: SKMEL28, B16F10, C6, U87MG. Xenografts were subcutaneously injected at a concentration of 2×10^6 cells per mouse and allowed to grow until tumors of 150 mm^3 were visible. Tumor bearing mice were used in biodistribution and imaging studies. On the day of the experiment, each mouse was injected with ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) (18.5 MBq), intravenously into the tail vein. Blocking experiments were conducted in U87MG implanted tumor in athymic nude mice and performed with a large excess of native c(RGDfK) (101.7 μg per kg per mice). Mice bearing U87MG tumors were scanned (15 min tomography) after 1 h post injection. Quantitative analysis was done using Amide 1.0.4 software and 3D image was processed on VIVID (Amira, San diego, USA) software.

SPECT-CT imaging of tumor bearing mice

SPECT was used as it allows high sensitivity sequential measurements in the same animal and quantification on samples. SPECT of tumor bearing mice was performed on a SPECT-CT Symbia® T2 (GE HealthCare) and in a same manner, SPECT TRIUMPH (GE HealthCare) trimodality system with N5F75A10 multipinhole collimator, mouse style with 1 mm aperture was used to acquire images. Mice were imaged in the prone position. Mice were first anesthetized with intraperitoneal injection of ketamine (100 mg kg^{-1}) and xylazine (10 mg kg^{-1}). Mice were injected with 18.5 MBq of ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) *via* tail vein. Residual activity of the syringe was quantified with activimeter measurement. The tomographic SPECT data acquisition was performed about 30 min after radiotracer injection. For each SPECT scan, regions of interests (ROIs) were drawn over each tumor, normal tissue and major organ and fixing volume were evaluated on FLEX SPECT TM version 1.0.7 in single reconstruction mode OSEM (Ordered Subset Expectation Maximization). The acquisition protocol was composed of 3 tomographies of 10 min associated to scan followed by a 30 min tomography with scan. The final sequence was constituted of 3 tomographies of 10 min each with scan. CT-reconstruction and SPECT-CT images were fused and analyzed with VIVID (Amira, San diego, USA). The mice were sacrificed by cervical dislocation 150 min post-injection. Negative controls were included using C6 xenograft model (murine melanoma model).

Biodistribution studies

We investigated the biodistribution as well as the elimination pathway of ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) in mice bearing melanoma or glioma tumors ($n = 25$). Biodistribution analyses combined two steps. The first approach used *in vivo* animal scintigraphic imaging in order to check the accumulation of the tracer in the tumor area as well as the main non-specific organs, the distribution and the pharmacokinetics parameters. A quantitative systematic biodistribution study was then performed using organ counting. The mice were sacrificed by cervical dislocation on average at 1, 2 and 4 h post administration.

Tumors and normal tissues (blood, lungs, heart, spleen, liver, bone, kidney, muscle and intestines) were removed from each animal. They were collected, weighed, and the amount of radioactivity was determined using a γ -counter. The percentage of injected dose per gram of tissue (% ID per g) or percentage of injected dose (% ID) was determined for each sample and tumor to organ ratios were calculated.

Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm standard deviation (SD). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism software (version 6.0, La Jolla California USA). Tracer activities and tracer activity ratios were compared using an unpaired *t* test. A *p* value ≤ 0.05 was considered significant.

Conclusions

The objective is now to target intimate mechanisms of oncogenesis and dissemination process of the disease. This option appears of great interest either for aggressiveness detection or for selection of responder to new-targeted therapies. Concerning the structure of the tracer, the dimeric RGD peptide ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) showed high *in vitro* integrin affinity and effective *in vivo* tumor targeting. Moreover, technetium is still the most widely available diagnostic radionuclide with optimal physical characteristics for SPECT. Although ^{18}F -labeled or ^{68}Ga -labeled derivatives will be interesting for PET positron emission tomography with advantages in terms of sensitivity and spatial resolution, ^{99m}Tc -derivates would remain the more widely available and clinically applicable.

Acknowledgements

This work was supported by the CNRS and Translational Research Advanced Imaging Laboratory of the University of Bordeaux. We are grateful to the nuclear department of university hospital helping for radiolabeling, and the anatomopathology department for providing the tissue sections. We thank the INSERM U1026 for its participation in micro and β -imaging. Acknowledgement to UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse (Oncopole, Toulouse, France) for providing us B16F10 and SKMEL28 cell lines.

References

- O. Schnell, B. Krebs, J. Carlsen, I. Miederer, C. Goetz, R. H. Goldbrunner, H. J. Wester, R. Haubner, G. Popperl, M. Holtmannspotter, H. A. Kretzschmar, H. Kessler, J. C. Tonn, M. Schwaiger and A. J. Beer, *Neuro-Oncology*, 2009, **11**, 861–870.
- J. Folkman, *Nat. Med.*, 1995, **1**, 27–31.
- J. J. Feige, *Bull. Cancer*, 2010, **97**, 1305–1310.
- I. Dijkgraaf, A. Y. Rijnders, A. Soede, A. C. Dechesne, G. W. van Esse, A. J. Brouwer, F. H. M. Corstens, O. C. Boerman, D. T. S. Rijkers and R. M. J. Liskamp, *Org. Biomol. Chem.*, 2007, **5**, 935–944.
- S. Liu, *Bioconjugate Chem.*, 2009, **20**, 2199–2213.
- R. H. Haubner, H. J. Wester, W. A. Weber and M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.*, 2003, **47**, 189–199.
- R. Haubner, H. J. Wester, F. Burkhart, R. Senekowitsch-Schmidtke, W. Weber, S. L. Goodman, H. Kessler and M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.*, 2001, **42**, 326–336.
- X. Chen, R. Park, Y. Hou, V. Khankaldyyan, I. Gonzales-Gomez, M. Tohme, J. R. Bading, W. E. Laug and P. S. Conti, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2004, **31**, 1081–1089.
- X. Chen, R. Park, A. H. Shahinian, J. R. Bading and P. S. Conti, *Nucl. Med. Biol.*, 2004, **31**, 11–19.
- S. Liu, Z. Liu, K. Chen, Y. Yan, P. Watzlowik, H. J. Wester, F. T. Chin and X. Chen, *Mol. Imag. Biol.*, 2010, **12**, 530–538.
- R. K. Jain, E. di Tomaso, D. G. Duda, J. S. Loeffler, A. G. Sorensen and T. T. Batchelor, *Nat. Rev. Neurosci.*, 2007, **8**, 610–622.
- P. Y. Wen and S. Kesari, *N. Engl. J. Med.*, 2008, **359**, 492–507.
- S. Negrier, P. Saiag, B. Guillot, O. Verola, M. F. Avril, C. Bailly, D. Cupissol, S. Dalac, A. Danino, B. Dreno, J. J. Grob, M. T. Leccia, C. Renaud-Vilmer and L. Bosquet, *Bull. Cancer*, 2006, **93**, 371–384.
- C. M. Balch, J. E. Gershenwald, S. J. Soong, J. F. Thompson, M. B. Atkins, D. R. Byrd, A. C. Buzaid, A. J. Cochran, D. G. Coit, S. Ding, A. M. Eggermont, K. T. Flaherty, P. A. Gimotty, J. M. Kirkwood, K. M. McMasters, M. C. Mihm, D. L. Morton, M. I. Ross, A. J. Sober and V. K. Sondak, *J. Clin. Oncol.*, 2009, **27**, 6199–6206.
- P. Queirolo and M. Acquati, *Cancer Treat. Rev.*, 2006, **32**, 524–531.
- C. Garbe, K. Peris, A. Hauschild, P. Saiag, M. Middleton, A. Spatz, J. J. Grob, J. Malvehy, J. Newton-Bishop, A. Stratigos, H. Pehamberger and A. M. Eggermont, *Eur. J. Cancer*, 2012, **48**, 2375–2390.
- C. K. Bichakjian, A. C. Halpern, T. M. Johnson, A. Foote Hood, J. M. Grichnik, S. M. Swetter, H. Tsao, V. H. Barbosa, T. Y. Chuang, M. Duvic, V. C. Ho, A. J. Sober, K. R. Beutner, R. Bhushan and W. Smith Begolka, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2011, **65**, 1032–1047.
- C. C. Kumar, H. Nie, C. P. Rogers, M. Malkowski, E. Maxwell, J. J. Catino and L. Armstrong, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1997, **283**, 843–853.
- J. E. Fisher, M. P. Caulfield, M. Sato, H. A. Quartuccio, R. J. Gould, V. M. Garsky, G. A. Rodan and M. Rosenblatt, *Endocrinology*, 1993, **132**, 1411–1413.
- C. Decristoforo, B. Faintuch-Linkowski, A. Rey, E. von Guggenberg, M. Rupprich, I. Hernandez-Gonzales, T. Rodrigo and R. Haubner, *Nucl. Med. Biol.*, 2006, **33**, 945–952.
- R. Haubner, B. Kuhnast, C. Mang, W. A. Weber, H. Kessler, H. J. Wester and M. Schwaiger, *Bioconjugate Chem.*, 2004, **15**, 61–69.
- B. Singh, C. Fu and J. Bhattacharya, *Am. J. Physiol.: Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2000, **278**, L217–L226.
- I. Tsiapa, G. Loudos, A. Varvarigou, E. Fragogeorgi, D. Psimadas, T. Tsotakos, S. Xanthopoulos, D. Mihailidis, P. Bouziotis, G. C. Nikiforidis and G. C. Kagadis, *Nucl. Med. Biol.*, 2013, **40**, 262–272.
- E. Morales-Avila, G. Ferro-Flores, B. E. Ocampo-Garcia, L. M. de Leon-Rodriguez, C. L. Santos-Cuevas, R. Garcia-Becerra, L. A. Medina and L. Gomez-Olivian, *Bioconjugate Chem.*, 2011, **22**, 913–922.
- D.-E. Lee, Y.-D. Hong, K.-H. Choi, S.-Y. Lee, P.-H. Park and S.-J. Choi, *Appl. Radiat. Isot.*, 2010, **68**, 1896–1902.
- R. Haubner, F. Bruchertseifer, M. Bock, H. Kessler, M. Schwaiger and H. J. Wester, *Nucl. Med.*, 2004, **43**, 26–32.
- J. Shi, L. Wang, Y. S. Kim, S. Zhai, B. Jia, F. Wang and S. Liu, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2009, **36**, 1874–1884.

- 28 L. Sancey, V. Ardisson, L. M. Riou, M. Ahmadi, D. Marti-Batlle, D. Boturyn, P. Dumy, D. Fagret, C. Ghezzi and J. P. Vuillez, *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2007, **34**, 2037–2047.
- 29 G. B. Fields and R. L. Noble, *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1990, **35**, 161–214.
- 30 R. Haubner, H. J. Wester, U. Reuning, R. Senekowitsch-Schmidtke, B. Diefenbach, H. Kessler, G. Stocklin and M. Schwaiger, *J. Nucl. Med.*, 1999, **40**, 1061–1071.
- 31 P. P. Hazari, G. Shukla, V. Goel, K. Chuttani, N. Kumar, R. Sharma and A. K. Mishra, *Bioconjugate Chem.*, 2010, **21**, 229–239.
- 32 S. K. Sethi, R. Varshney, S. Rangaswamy, N. Chadha, P. P. Hazari, A. Kaul, K. Chuttani, M. D. Milton and A. K. Mishra, *RSC Adv.*, 2014, **4**, 50153–50162.
- 33 R. A. Orlando and D. A. Cheresch, *J. Biol. Chem.*, 1991, **266**, 19543–19550.

PARTIE 2

Transposition de nos techniques d'analyse pour l'évaluation du ^{18}F - ribofuranose-RGD et de l' ^{111}In -DOTA-F3B

Article 2 : “*Ex Vivo* and *in Vivo* Imaging and Biodistribution of Aptamers Targeting the
Human Matrix MetalloProtease-9 in Melanomas”

Plos One soumis

David Kryza, **Frédéric Debordeaux**, Laurent Azéma, Aref Hassan, Olivier Paurelle, Jorgen
Schulz, Catherine Savona-Baron, Elsa Charignon, Pauline Bonazza, Jacqueline Taleb,
Philippe Fernandez, Marc Janier and Jean Jacques Toulmé

Dans un deuxième temps, nous avons adapté ces différentes techniques d'analyse pour l'évaluation de radiotraceurs de la néoangiogenèse étudiés dans le cadre de projets collaboratifs.

Le ^{18}F -ribofuranose-RGD, est destiné à l'imagerie par tomographie par émission de positons de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Le ligand froid a été synthétisé par l'équipe de chimie (Synthesis-Bioactive Molecules Group) de l'Institut des Sciences Moléculaires (ISM) CNRS UMR 5255 de Bordeaux. Du fait des contraintes relatives aux rayonnements de haute énergie, les travaux réalisés sur le traceur fluoré ont rapidement évolué vers la phase préclinique chez l'animal. Ce travail a été réalisé en collaboration avec l'équipe INSERM UMR 1037 (Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse, Oncopôle).

L'étude de l' ^{111}In -DOTA-F3B a été effectuée en partenariat avec l'ARNA (ARN : Régulations Naturelle et Artificielle) INSERM UMR 869 de Bordeaux, qui a développé ce ligand ciblant la MMP-9 et l'Institut Lumière Matière (ILM) CNRS UMR 5306 de Lyon, qui a notamment mis au point le radiomarquage du traceur. Nous nous sommes focalisés sur le développement et la réalisation des techniques d'immunohistochimie et de radiomarquage sur coupes tissulaires.

1. Le ^{18}F -ribofuranose-RGD

1.1. Synthèse, marquage et purification du dérivé fluoré

1.1.1. Matériels et méthodes

1.1.1.1. Synthèse du peptide ribofuranose-RGD

L'élaboration de ce peptide doit permettre une étape de fluoration directe. Cette dernière stratégie peut se faire selon deux voies : soit le fluor 18 est intégré directement par formation d'une liaison carbone-fluor (C-F), soit le fluor établit une liaison avec un élément non carboné (Y-F), tel que le bore, l'aluminium ou le silicium. Actuellement, la voie radiochimique utilisant la liaison silicium-fluor est la plus aboutie pour le marquage en dernière étape de synthèse. Cela aboutit à un marquage, site spécifique, en une seule étape, dans des conditions douces (basse température). Le choix d'un dérivé fluorosilylé a donc été fait pour assurer le marquage de la molécule.

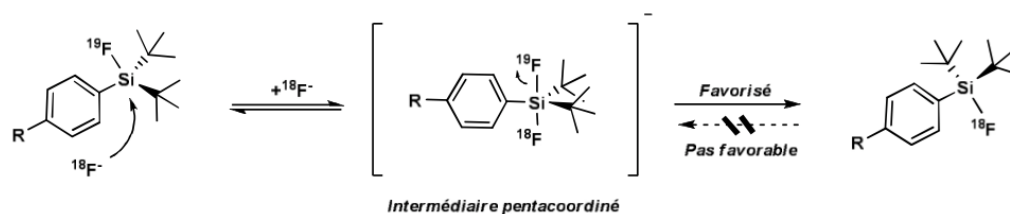


Figure 35 : Principe du marquage par échange isotopique

Une réaction de fluoration reposant sur l'énergie de la liaison Si-F a récemment été développée ($135 \text{ kcal.mol}^{-1}$ versus $116 \text{ kcal.mol}^{-1}$ for C-F) [189]. Cette technique autorise ensuite une réaction de substitution de l'atome de fluor sur le silicium afin de permettre un radiomarquage au fluor 18 en une seule étape, compatible avec des oligonucléotides fragiles et déprotégés (**Figure 35**) [190].

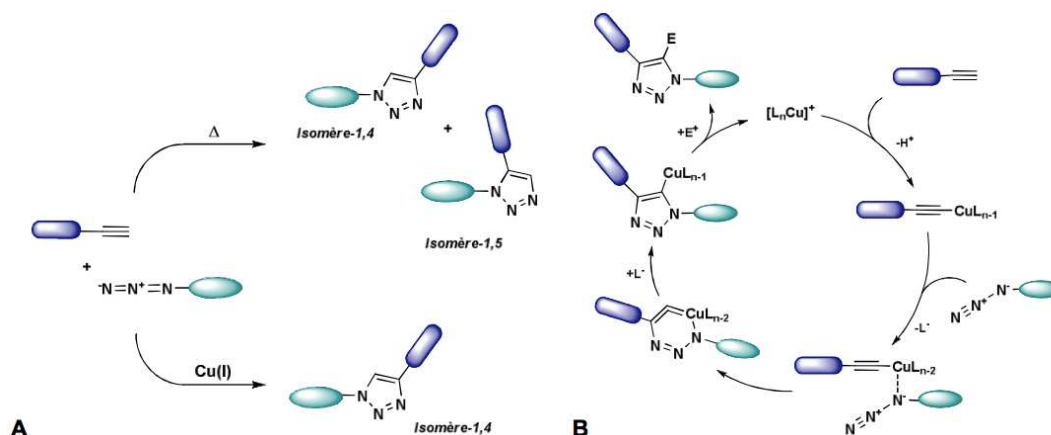


Figure 36 : Schéma présentant : (A) la régiosélectivité de la réaction de « chimie click » et, (B) le mécanisme de la CuAAC

d'après Bordenave T., Apport de la « chimie click » pour le marquage au carbone-11 et au fluor-18 de nucléosides et d'oligonucléotides. Doctorat Chimie Organique. Université de Bordeaux ; 14 décembre 2012.

La synthèse du peptide a aussi reposée sur le principe de la « chimie click ». Il s'agit d'une méthode simple d'assemblage moléculaire permettant d'obtenir des produits avec de bons rendements, dans des conditions douces, totalement tolérante vis-à-vis d'autres groupements fonctionnels. Cette réaction a été décrite pour la première fois par Huisgen dans les années 1960. Depuis, cette réaction a évolué avec l'introduction d'une catalyse au cuivre (I) (Copper Catalysed Azoture-Alcyne Cycloaddition, CuAAC) permettant d'obtenir une régiosélectivité totale conduisant uniquement à la formation de l'isomère 1,4 (**Figure 36**).

La synthèse combine donc les avantages de la chimie click et aussi ceux d'un radiomarquage en une seule étape grâce au dérivé silylé. Le procédé a été décrit précédemment [191]. Brièvement, la première étape élabore le support de synthèse associant la fonction alcyne et l'introduction du silicium. L'alcyne est ici l'un des partenaires nécessaires pour la première réaction « click ». La composante sucrée, le 1-azido-ribose, est obtenue à partir de 1,2,3,5-tetra-*O*-acetyl- β -D-ribofuranose ou de 1-*O*-acetyl-2,3,5-tri- β -D-ribofuranose disponibles dans le commerce. Puis, une réaction de cyclo-addition de Huisgen est pratiquée à partir du support de synthèse et du 1-azido-ribose.

En parallèle, le cyclo-RGDN₃ est synthétisé. Les peptides linéaires sont assemblés en phase solide, en appliquant la stratégie Fmoc.

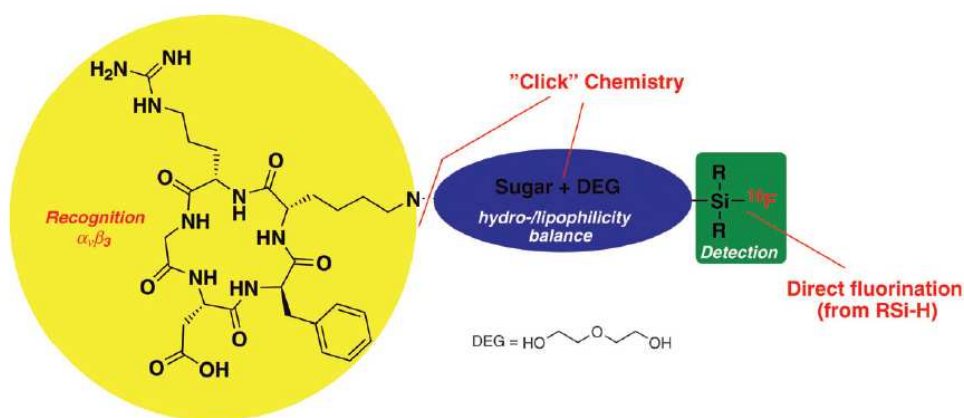


Figure 37 : Structure du ^{18}F - ribofuranose-c(RGDfK)

En dernière étape, les deux partenaires, sont associés grâce à une nouvelle étape de cyclo-addition de Huisgen. Ceci permet l'obtention du ribofuranose-RGD, sous forme de précurseur SiH restant à radiomarquer (**Figure 37**).

1.1.1.2. Radiomarquage du ribofuranose-c(RGDfK) par le fluor 18

Le radiomarquage au fluor 18 est réalisé sur l'automate TRACERLab FxN[®] (Ge Healthcare).

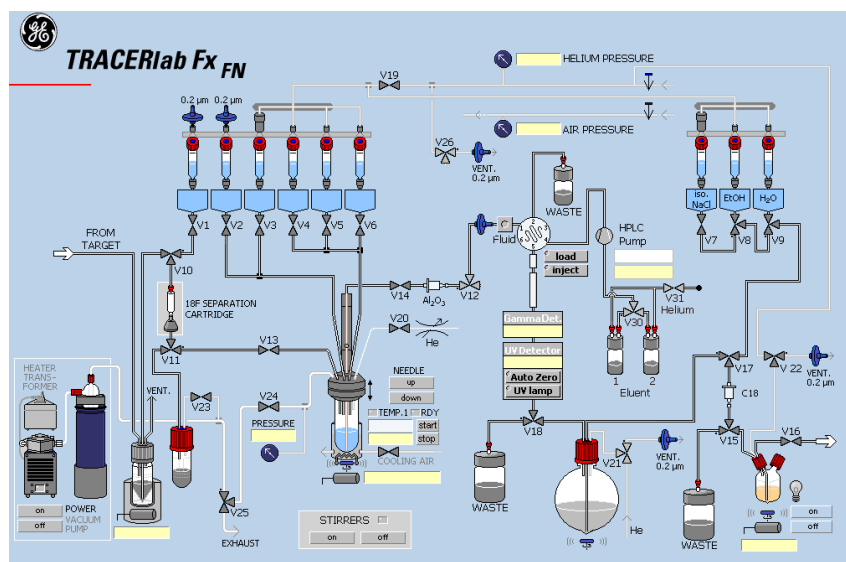


Figure 38 : Représentation de l'interface informatique écrite grâce au programme « synthetiser FxF-N tracerLab ». La séquence est constituée d'une succession d'évènements programmés dans le temps (ouverture et fermeture des vannes, chauffage ou refroidissement du réacteur...)

Les différentes étapes du procédé de radiosynthèse sont réalisées de façon programmée (logiciel "synthetiser FxF-N TracerLab"). Cependant, un contrôle manuel des différents composants (température du réacteur, électrovannes, débit de la pompe de CLHP, ...) reste possible, *via* l'interface informatique, durant toute la synthèse (**Figure 38**).

Dans un premier temps, la cible d' H_2^{18}O est bombardée par un faisceau de protons (17 MeV, 40 μA) pendant le temps nécessaire, en fonction de l'activité souhaitée pour la synthèse (2 heures en général). Ensuite, la solution d'eau irradiée est transférée de manière automatisée vers l'automate de synthèse Tracerlab FxF-N situé dans une enceinte blindée.

Sous la pression d'un flux d'azote, l'eau irradiée contenant les fluorures 18 passe sur une résine échangeuse d'anions de type Sep-Pak Accell Plus QMA (résine $\text{CO-NH}(\text{CH}_2)_3\text{N}^+(\text{CH}_3)_3 \text{Cl}^-$). Les anions fluorures 18 sont alors captés par la résine et l'eau enrichie résiduelle est collectée dans un flacon. Ces ions fluorures sont ensuite élués de la résine échangeuse d'ions par un mélange de Kryptofix [2.2.2] (22 mg)/carbonate de potassium (7 mg) dilué dans un mélange acétonitrile/eau (50/50, 600 μL), et sont recueillis au niveau du réacteur de l'automate. La solution est évaporée sous vide pendant 8 minutes à 100 °C afin d'éliminer toutes traces d'eau. De l'acétonitrile (250 μL) est rajouté en petite quantité afin de former un azéotrope avec l'eau. L'opération est répétée 4 fois, puis une évaporation est lancée afin de sécher le complexe $^{18}\text{F}/\text{K}2.2.2$.

Une fois les fluorures "secs", le précurseur dissout dans le solvant de réaction (5 mg avec 3 μL d'acide acétique glacial dans 300 μL de DMSO) est additionné au complexe $^{18}\text{F}/\text{K2.2.2}$. dans le réacteur, préalablement refroidi par un flux d'hélium jusqu'à atteindre 70 °C. La solution est ensuite chauffée (100 °C, 15 minutes) afin d'effectuer la fluoration par substitution nucléophile. La solution est alors refroidie avant l'ajout de 2 mL de CH_3CN et 3 mL d'eau pour effectuer l'injection sur la CLHP semi-préparative (50/50 ($\text{CH}_3\text{CN}/(\text{H}_2\text{O}/\text{TFA}$, 0,2%,v/v)), 2,5 mL/min, $R_t = 17$ minutes) [190].

1.1.1.3. Purification et contrôle qualité du radiotraceur

Afin de purifier le peptide, le mélange réactionnel est passé sur une CLHP (colonne C18, Luna 250 x 10 mm x 10 μm , détecteur UV réglé à 220 nm, détecteur de radioactivité de type NaI). A l'aide d'une vanne pilotée par le module, le produit d'intérêt est collecté dans un ballon pour formulation. Ce ballon contient 40 mL d'EPPI afin de diluer la fraction collectée de la CLHP. La formulation est ensuite effectuée sur une cartouche Sep-Pak C18 afin d'éliminer les solvants issus de la CLHP qui ne sont pas injectables à l'Homme. La solution est enfin rincée avec 10 mL d'EPPI. Le RGD est élué de la cartouche avec 2 mL d'éthanol, qui sont récupérés dans le dernier flacon de collecte. La cartouche est à nouveau rincée par 2 mL de NaCl 0,9 %. Cette solution est transférée dans l'enceinte de répartition pour dilution, distribution et contrôle qualité.

Dans l'enceinte de répartition, la masse et l'activité de la solution mère sont mesurées afin de déterminer l'activité volumique. Cette solution mère est diluée avec du NaCl 0,9 % pour ajuster l'osmolarité. L'activité, mesurée à l'aide d'un activimètre, permet de connaître le rendement radiochimique de la synthèse.

Le contrôle qualité de la préparation comprend une évaluation de l'apparence de la solution, qui doit être limpide, incolore et exempte de particules. Le pH est mesuré à l'aide d'une bandelette colorimétrique de sensibilité 0,3 unité pH (10 μL de solution finale sont déposés). Pour chaque radiopharmaceutique, il existe en effet un intervalle de pH dans lequel la stabilité du produit est optimale.

La pureté radiochimique est définie comme étant le rapport (%) de la radioactivité du radionucléide d'intérêt dans la source sous la forme chimique désirée, sur l'activité totale de la source. La pureté chimique correspond, pour sa part, au rapport de la masse de produit d'intérêt (forme chimique désirée) sur la masse totale de matière dans la source (à l'exception

des excipients et solvants). Elles sont évaluées en injectant 20 μL de solution finale dans une CLHP analytique (colonne Luna C18 250 x 4,6 mm conditionnée à 1 mL/min avec un éluant CLHP (CH_3CN /solution aqueuse d'acide trifluoracétique 0,1 % (50/50), 1 mL/min, R_t = 10,46 minutes) équipée d'un détecteur UV réglé à 220 nm et d'un détecteur de radioactivité. Cette technique permet de déterminer les impuretés, produits secondaires présents dans la solution finale.

La pureté radionucléidique est définie par spectrométrie gamma et permet de vérifier que le fluor 18 est le seul radioélément présent dans la solution finale (rapport de la radioactivité du nucléide d'intérêt sur la radioactivité totale de la source). Quelques microlitres de solution finale sont donc placés devant un spectrophotomètre gamma calibré (NaI (Tl) ou germanium). Un pic unique doit être observé à 511 keV (éventuellement un pic somme à 1022 keV peut être visualisé). La période est aussi contrôlée sur activimètre et identifie le fluor 18 avec une demi-vie de 109,8 minutes.

Il est à noter que durant la synthèse, sept paramètres différents sont enregistrés continuellement, puis archivés pour chaque synthèse. Ces paramètres comprennent l'enregistrement de l'activité par quatre détecteurs de radioactivité (récupération cible, réacteur, produit final, CLHP), l'enregistrement de la pression et de la température dans le réacteur, et l'enregistrement du spectre UV de la CLHP.

1.1.2. Résultats

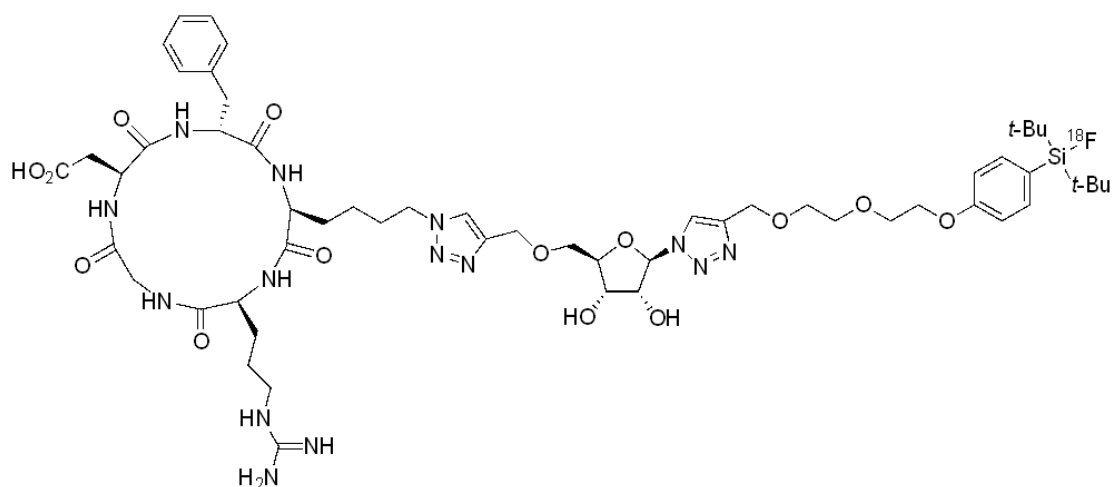


Figure 39 : ^{18}F -ribofuranose-RGD

La synthèse du précurseur ribofuranose RGD est décrite à l'annexe 3. L'ensemble de la technique de marquage a été réalisé sur le module TRACERLab Fx-F-N[®] (Ge Healthcare) qui est un automate utilisé en recherche et développement pour les synthèses avec substitution nucléophile du fluor 18. Afin d'optimiser le radiomarquage, de multiples essais ont été effectués. Le récapitulatif des premiers essais est présenté dans l'annexe 4. La radiosynthèse du ¹⁸F-ribofuranose-RGD est pratiquée en 15 minutes à 100 °C (**Figure 39**). Le pH de la solution finale obtenue est de 5,3.

Le rendement radiochimique de la synthèse est de l'ordre de 20 % avec une activité spécifique de 180 GBq.μmol⁻¹.

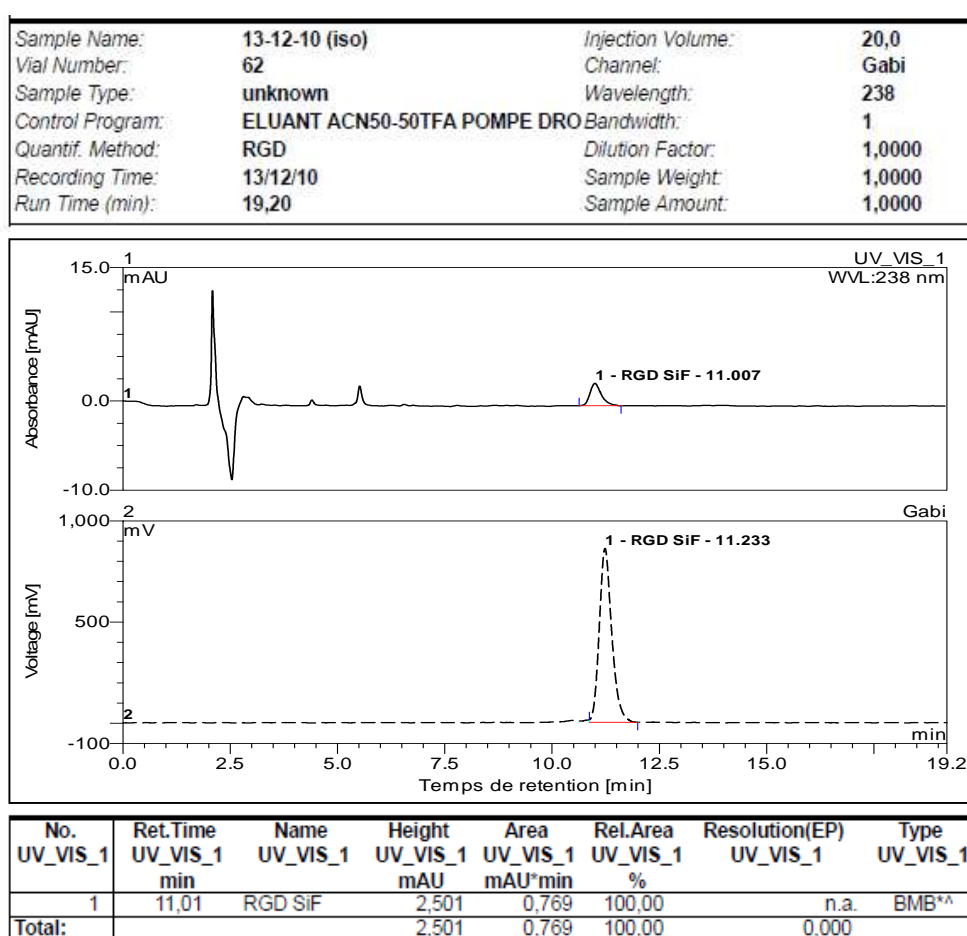


Figure 40 : Chromatographie réalisée dans le cadre du contrôle de la pureté radiochimique du ¹⁸F-ribofuranose-RGD. L'aire sous la courbe du pic du traceur fluoré est > 95 %

La pureté radiochimique est évaluée à l'aide d'une CLHP couplée à un détecteur UV et à un détecteur de radioactivité. La pureté radiochimique est > 95 % (**Figure 40**). La pureté radionucléidique, définie par spectrométrie gamma, indique une valeur d'énergie de 511 KeV caractéristique des émetteurs de positons, donc ici le fluor 18. L'évaluation de la période du radionucléide confirme l'identification du fluor 18.

L'ensemble des contrôles permet l'identification du radiotraceur, et confirme la pureté et la qualité du produit final utilisé pour l'expérimentation animale.

1.2. Exploration *in vivo* chez le petit animal

1.2.1. Matériels et méthodes

1.2.1.1. Analyse préclinique chez la souris du dérivé fluoré

1.2.1.1.1. Imagerie TEP/TDM chez la souris C57Black/6

L'administration chez l'animal permet d'obtenir des renseignements sur les voies de métabolisation et la biodistribution des traceurs. L'imagerie TEP-TDM, sur imageur clinique est réalisée à Toulouse en collaboration avec l'équipe de Sandrine et Marc Poirot de l'INSERM UMR 1037 à l'aide d'un modèle B16F10 de mélanome murin syngénique de la souris (C57Black/6).

Pour ce faire, 50000 cellules B16F10 sont injectées en sous-cutané sur le flanc des souris C57Black/6. Lorsque les tumeurs ont atteint un volume suffisant ($\approx 150 \text{ mm}^3$), une activité moyenne de $7,4 \pm 1,85 \text{ MBq}$ de traceur fluoré est injectée dans la veine caudale. Puis, chaque animal est anesthésié par injection intrapéritonéale d'une solution kétamine + xylazine (respectivement à 100 mg/kg et 10 mg/kg). L'activité résiduelle restant dans chaque seringue est quantifiée à l'activimètre. Après un délai d'environ 30 minutes, les animaux toujours anesthésiés, sont disposés sur un support alvéolé non atténuant (polystyrène extrudé à faible densité électronique) pour l'acquisition dynamiques des données TEP-TDM (TEP-TDM Discovery ST[®] General Electric Health Care, GEHC).

Le protocole d'acquisition s'applique sur un champ de vue de 20 cm de diamètre. L'acquisition dynamique s'effectue lors d'un pas de quinze minutes au total. Les coupes tomodensitométriques sont de 1,25 mm d'épaisseur tous les 0,6 mm et pour la TEP, les coupes sont de 3,27 mm tous les 3,27 mm soient 47 coupes par pas d'acquisition (environ 15,3 cm). A la fin de l'acquisition, les animaux sont sacrifiés.

Le traitement des images s'effectue sur les stations Xeleris et Advantage Workstation 4.2[®] (GEHC). Le signal est analysé de manière visuelle ou semi-quantitative, et le volume fixant est également estimé à partir d'une segmentation.

1.2.1.1.2. Etude de la biodistribution du ^{18}F -ribofuranose-RGD chez l'animal

L'analyse de la biodistribution du ^{18}F -ribofuranose-RGD repose sur deux types de techniques différentes. D'une part, la biodistribution du traceur a dans un premier temps été appréhendée lors de l'imagerie dynamique TEMP-TDM. Suite au passage caméra, les tumeurs de chaque souris sont mesurées (mesure de contrôle) puis prélevées par dissection et la radioactivité fixée par la tumeur est mesurée dans un compteur gamma (1470-Wizard). Cette fixation est donc définie de façon quantitative, de même que les activités physiques du sang, et des principaux organes de l'animal.

En parallèle, des analyses spécifiques de la biodistribution sont réalisées. Comme précédemment, 50000 cellules B16F10 en sous-cutané sur le flanc des souris C57Black/6. Une fois un volume tumoral de 150 mm^3 atteint, les souris sont anesthésiées et $7,4 \pm 1,85$ MBq de ^{18}F -ribofuranose-RGD sont injectés au niveau caudal. L'activité résiduelle restant dans chaque seringue est quantifiée à l'activimètre. Les animaux, encore endormis, sont sacrifiés par dislocation vertébrale à différents temps post-injection. Les principaux organes sont prélevés (sang, poumons, cœur, rate, foie, os, reins, muscles et intestins), et la biodistribution du traceur est quantifiée. Chaque organe est pesé et la radioactivité est mesurée à l'aide d'un gamma-compteur (1470-Wizard). Les résultats sont exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme de tissus (% ID/g) ou en pourcentage de dose injectée (% ID) pour chaque organe, et les ratios de fixation tumeurs sur organe sont calculés.

1.2.2. Résultats

1.2.2.1. Imagerie TEP/TDM chez la souris C57Black/6

L'injection du peptide fluoré, ^{18}F -ribofuranose-RGD, à des souris C57Black/6 ($n = 14$) greffées de mélanomes syngéniques B16F10 a permis d'identifier et de localiser les tumeurs (**Figure 41**). Pour les tumeurs de taille importante, il est possible de visualiser une moindre fixation du traceur dans la région centrale soulignant vraisemblablement la présence de zone nécrotique et d'une angiogenèse tumorale plus réduite à ce niveau. L'acquisition des images 75 minutes après injection permet de visualiser les tumeurs avec un bon contraste vis-à-vis du bruit de fond environnant. Une fixation tumorale conséquente est observée avec un ratio de fixation tumeur/bruit de fond de $6,1 \pm 1,5$.

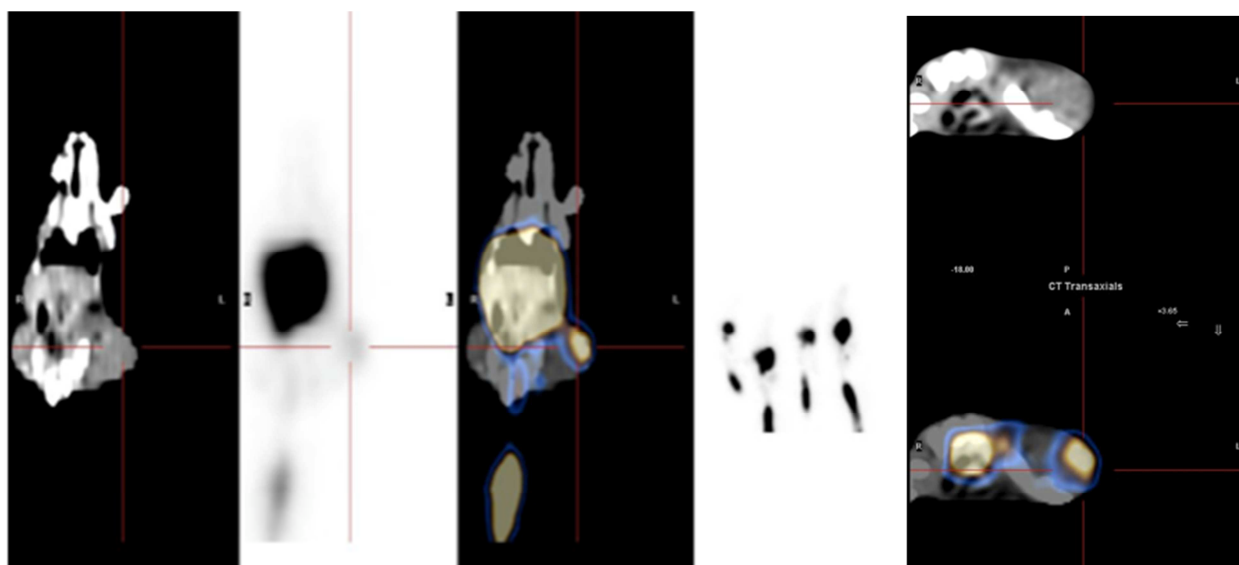


Figure 41 : Coupes axiales et transversales de souris C57black/6 porteuses de mélanomes murins B16F10. La tumeur est clairement identifiable

1.2.2.2. Etude de la biodistribution du ^{18}F -ribofuranose chez l'animal

Les souris C57Black/6 sont sacrifiées et disséquées en moyenne 150 min p.i. ($n = 8$). L'activité présente dans les principaux organes, la tumeur et le compartiment circulant, est mesurée au compteur gamma (**Figure 42**). Les résultats sont exprimés en pourcentage de dose injectée par gramme de tissu (%ID/g). Une forte activité est retrouvée au niveau digestif avec les valeurs les plus importantes pour l'estomac ($5,71 \pm 5,08$ % ID/g), le foie ($13,46 \pm 7,25$ % ID/g) et les intestins ($19,03 \pm 8,95$ % ID/g). La vésicule biliaire est l'organe pour lequel l'activité retrouvée est la plus conséquente soit $58,74 \pm 28,31$ % ID/g, *a contrario* l'activité rénale ne représente que $1,24 \pm 0,51$ % ID/g. Le radiotracer possède donc une élimination essentiellement digestive. L'imagerie TEP-TDM indique une clairance rapide du traceur du compartiment sanguin. Lors de l'étude de biodistribution, l'activité retrouvée dans le sang est de $0,54 \pm 0,28$ % ID/g.

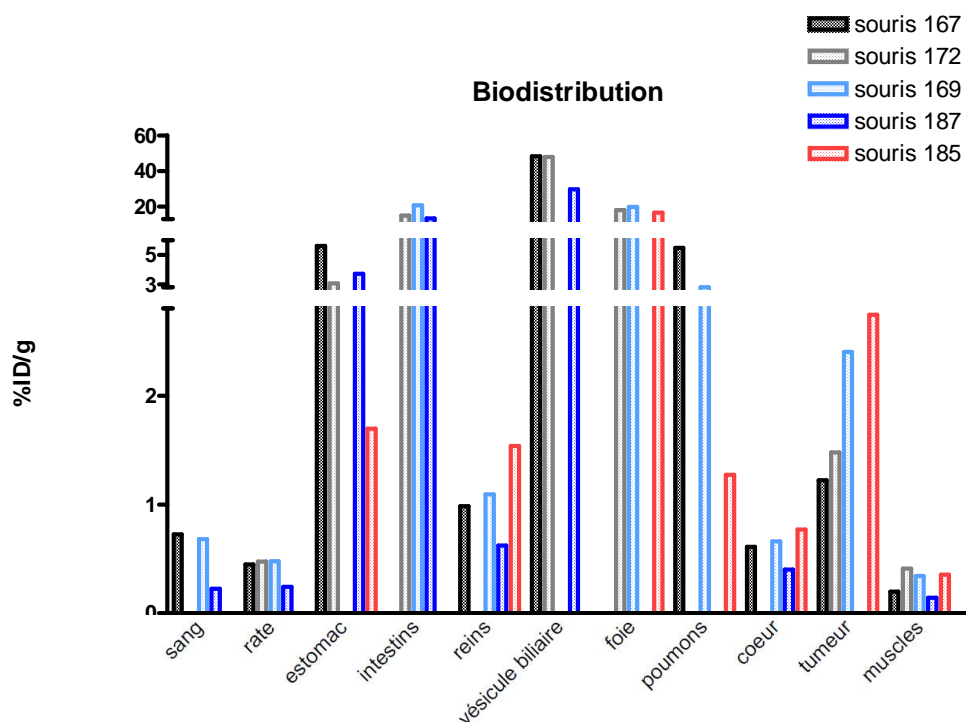


Figure 42 : Histogramme représentant les résultats de l'analyse de la biodistribution du ^{18}F -ribofuranose-RGD chez des souris black porteuses de tumeurs mélaniques B16F10. Les essais témoignent d'une activité digestive importante mais aussi d'une bonne fixation et rétention tumorale

Les muscles sont considérés comme témoin négatif de la fixation du dérivé RGD fluoré. Le traceur présente une fixation tumorale correcte ($1,73 \pm 0,81$ % ID/g). La valeur moyenne du ratio de fixation tumeur sur tissus sains environnants (muscles) est de $6,07 \pm 1,57$, ce qui permet une identification tumorale nette (**Figure 43**). L'imagerie réalisée à 75 minutes permet une bonne visualisation des tumeurs B16F10 avec un bon contraste vis-à-vis des tissus sains.

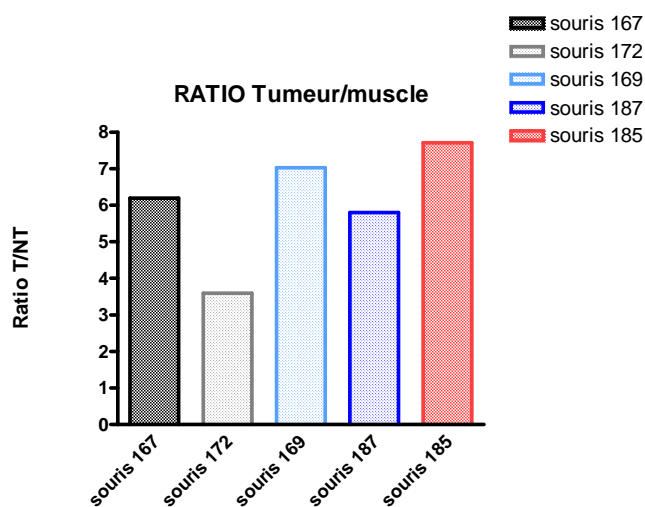


Figure 43 : Ratios de fixation tumeur/muscle obtenus chez des souris C57Black/6 greffées de tumeurs B16F10. La valeur moyenne est de $6,07 \pm 1,57$

L'intérêt et l'efficacité du ^{18}F -ribofuranose-RGD dans le cadre de l'évaluation de thérapie innovante anti-angiogénique ont été testés ($n = 15$). Les conditions opératoires sont similaires et se déroulent chez la souris C57Black/6 xéno greffée de tumeurs syngéniques B16F10. Un échantillon de sept souris témoins, sans thérapeutique, est comparé à huit souris pour lesquelles un traitement anti-angiogénique expérimental est appliqué. Ces tests apportent des données supplémentaires de biodistribution confirmant l'élimination à prédominance digestive du radiotraceur.

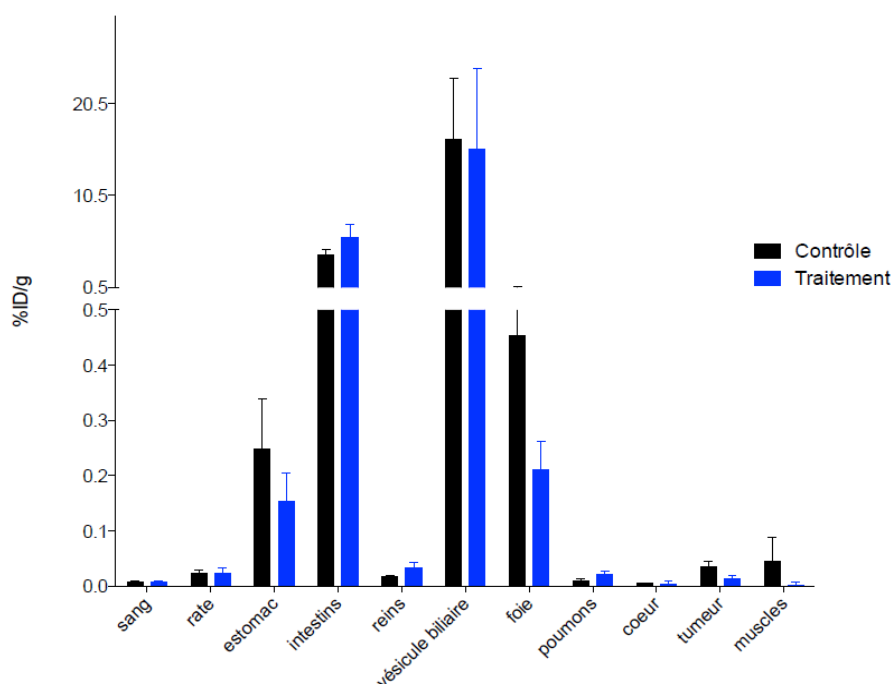


Figure 44 : Biodistribution comparative du ^{18}F -ribofuranose-RGD chez des souris black porteuses de tumeurs mélaniques B16F10, traitées ou non par un médicament expérimental anti-angiogénique. Les essais témoignent d'une activité digestive majoritaire.

La comparaison des deux groupes d'animaux confirme une élimination majoritairement digestive du traceur, avec les activités les plus importantes retrouvées au niveau intestinal ($3,98 \pm 0,74$ % ID/g), et de la vésicule biliaire ($16,62 \pm 8,17$ % ID/g) *versus* $0,02 \pm 0,01$ % ID/g au niveau des reins (**Figure 44**).

Les ratios de fixation tumeur/muscles pour les souris contrôle, dont le développement tumoral n'a pas été endigué par la mise en place d'une thérapeutique, et pour les souris traitées, présentent des valeurs significativement différentes. Les résultats sont respectivement de $12,18 \pm 5,32$ et $2,24 \pm 0,50$ (test t de Student non apparié, $p < 0,05$) (**Figure 45**).

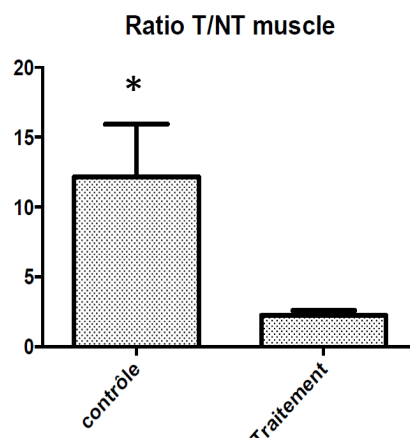


Figure 45 : Ratios de fixation tumeur/muscles obtenus chez des souris C57Black/6 greffées de tumeurs B16F10 traitées ou non. Une différence significative est observée entre le groupe traité et le groupe témoin.

L'application de tests *in vitro* développés pour le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) n'a malheureusement pas donné les résultats escomptés. L'affinité du ^{18}F -ribofuranose-RGD n'a pu être démontrée du fait de problème de solubilisation aux concentrations nécessaires pour la réalisation de cette technique.

2. L' ^{111}In -DOTA-F3B

2.1. Synthèse et radiomarquage du traceur

2.1.1. Matériels et méthodes

Ce travail a été réalisé en collaboration avec les équipes du Pr Jean-Jacques Toulmé (ARNA, INSERM UMR 869), et du Pr Marc Janier (ILM, CNRS UMR 5306).

Le traceur utilisé pour le ciblage de la MMP-9 est un aptamère radiomarqué à l'indium 111. Les aptamères sont des oligonucléotides (ADN ou ARN) modifiés. Ils présentent de nombreux avantages. En effet, ils sont utilisés pour la détection de multiples cibles : acides nucléiques, peptides, virus, cellules, etc. Du fait de leur grande flexibilité, ils se lient avec une haute affinité et spécificité. Enfin, ils sont synthétisés de façon relativement facile [192,193]. Les aptamères sont obtenus à partir d'un processus itératif *in vitro* de sélection et d'amplification appelé méthode SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential

enrichment) à partir de banques pouvant contenir jusqu'à 10^{15} séquences différentes [194–196].

Ces aptamères sélectionnés peuvent ensuite faire l'objet de modifications chimiques sans altération de leur capacité de ciblage, en vue de constituer de puissants outils à usage biomédical. Par ailleurs, les aptamères obtenus par cellule-SELEX sont particulièrement intéressants pour la détection de protéines membranaires et de récepteurs [197,198].

L'aptamère F3B sélectionné possède les qualités requises pour l'imagerie de la MMP-9, c'est-à-dire, une affinité de l'ordre du nanomolaire, une liaison hautement spécifique et une résistance aux nucléases. Ce composé a été utilisé pour la préparation de F3B-Cy5, F3B-S-acetylmercaptoacetyltriglycine (MAG) et F3B-DOTA [199].

2.1.1.1. Synthèse du F3B-DOTA

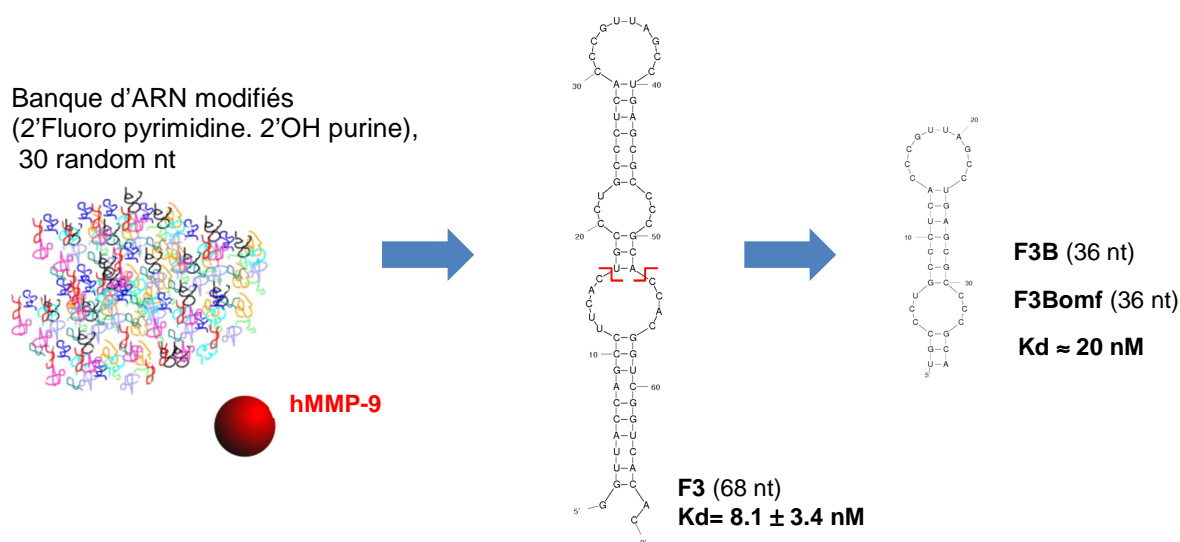


Figure 46 : Méthode de sélection et d'élaboration de l'aptamère F3B

Le F3B et la séquence de contrôle, portant une fonction hexylamine en 5', ont été produits (≈ 1 μ mol) à l'aide d'un synthétiseur d'acides nucléiques ABI Expedite 8909, en utilisant la méthode phosphoramidite (2'OMe-purine and 2'F-pyrimidine).

Une fois purifiés par électrophorèse sur gels dénaturant (20 % (19 :1 acrylamide/bis-acrylamide), urée 7 M, Tampon Tris-Borate-EDTA), les oligonucléotides sont conjugués au DOTA selon une méthode similaire à celle décrite pour le MAG3 [199]. Brièvement, 20 nmol d'oligonucléotides (F3B-Spacer18-NH₂ ou contrôle-Spacer18-NH₂) sont remis en suspension dans 100 μ L de tampon de couplage (sodium bicarbonate/ sodium carbonate 0,25 M), pH 8,3,

chlorure de sodium 1 M, EDTA 1 mM), puis soumis à agitation douce à température ambiante (**Figure 46**).

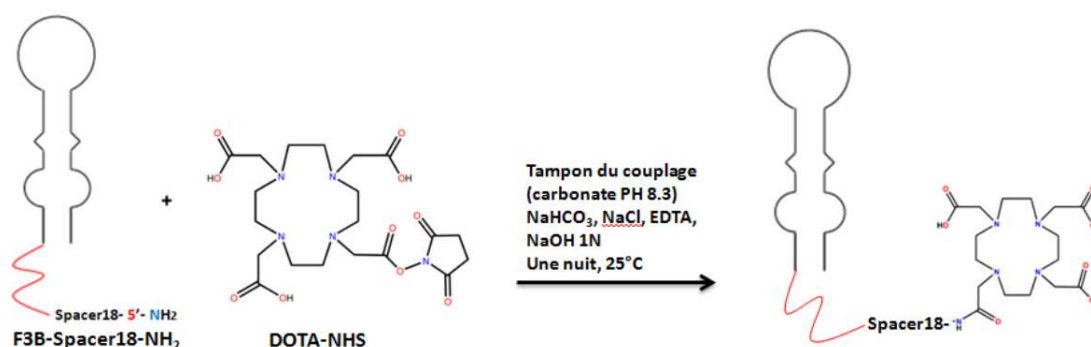


Figure 47 : Couplage du F3B-Spacer-NH₂ avec le chélateur DOTA

Le DOTA-NHS ester (ChematechR) (3 mg dans 30 μ L de DMF) est ajouté progressivement à température ambiante sur 3 heures. L'agitation est maintenue une heure supplémentaire, puis la solution est injectée directement en CLHP pour purification (Colonne Macherey-Nagel Nucleodur[®], 0,1 M d'acétate de triéthylammonium, pH 7,0, gradient (acétonitrile/0,1 M d'acétate de triéthylammonium, pH 7 : 80/20)). L'oligonucléotide couplé au DOTA est obtenu avec un rendement de 50-90 %, et est analysé par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Reflex III, Bruker) ou par ionisation par électronébuliseur (LCT Premier, Waters) (**Figure 47**).

2.1.1.2. Radiomarquage de l'aptamère à l'indium 111

Le radiomarquage de l'aptamère conjugué, F3B-DOTA, et de la séquence de contrôle, contrôle-DOTA, (20 μ g) sont réalisés par la mise en présence de 300 μ L de tampon acétate 0,1 M, pH 5 et de 30-70 MBq de chlorure d'indium 111 à température ambiante durant 45 minutes. L'indium libre est éliminé à l'aide d'une colonne d'exclusion stérique. Cette colonne est dans un premier temps préparée par 15 mL de tampon acétate 0,1 M. La solution de marquage est ensuite chargée sur la colonne, l'élution étant effectuée à l'aide de tampon acétate. L'¹¹¹In-DOTA-F3B et l'¹¹¹In-DOTA-contrôle sont éluées dans la première fraction.

La pureté radiochimique de chaque fraction de 0,5 mL est contrôlée par chromatographie couche mince sur support ITLC-SG (Agilent) et avec une phase mobile composée de tampon citrate 50 mM, pH 5. L'¹¹¹In-DOTA-F3B et le contrôle demeurent au dépôt, alors que l'indium libre migre au niveau du front avec un R_f de 0,9-1. Enfin, les fractions de haute pureté radiochimiques sont réunies.

2.1.2. Résultats

Après purification par chromatographie d'exclusion stérique, l'aptamère radiomarké à l'indium 111 est obtenu avec une pureté radiochimique > 96 %. Le rendement radiochimique de marquage est de 15-20 %. Le conjugué radiomarké présente une bonne stabilité quatre heures après marquage. L'étude de stabilité réalisée à l'ILM après incubation du radiotraceur 4 heures à 37 °C dans du PBS pH 7,4 témoigne d'une pureté radiochimique > 95 %.

2.2. Etudes *ex vivo* sur coupes tumorales

2.2.1. Matériels et méthodes

2.2.1.1. Analyse immunohistochimique sur coupes de tumeurs

Les techniques ont dans un premier temps été mises au point sur tumeur mélanique humaine A375 fournie par le l'ILM, avant d'être ensuite transposées chez l'Homme. Les échantillons utilisés dans ces études ont été fournis par le Centre de Recherche Biologique de Toulouse. Ces prélèvements ont été obtenus après obtention du consentement éclairé des patients. La tumorothèque de Toulouse est déclarée auprès du Ministère de l'Enseignement supérieur et de la Recherche (DC-2008-463) et l'autorisation de transfert a été obtenue après approbation des comités d'éthiques (AC-2008-820), et les déclarations au CNIL ont été effectuées (Comité National Informatique et Libertés).

Différents types de coupes de tumeurs bien caractérisées ont ainsi été obtenus, fixés au formol et inclus en paraffine (Mélanome à extension superficielle, mélanome nodulaire, mélanome acral lentigineux, mélanome de Dubreuilh, métastases et ganglions).

L'immunohistochimie sur ces coupes tumorales a pour objectif de valider les futures étapes de radiomarquage sur des coupes adjacentes, en termes de spécificité de ciblage. Pour cela, un anticorps murin monoclonal anti-MMP9 humaine a été utilisé (ab58803, Abcam). Des contrôles positifs et négatifs sont incorporés afin de valider la technique.

Les coupes, de 5 µm d'épaisseur, sont dans un premier temps déparaffinées dans deux bains de xylène (5 et 3 minutes), puis réhydratées dans des bains d'alcool de titre décroissant (100°, 95°, 70°, 2 x 5 minutes), et lavées à l'eau distillée (2 x 5 minutes). La peroxydase

endogène est ensuite inhibée, et un démasquage des sites antigéniques est pratiqué pour permettre une meilleure qualité de marquage.

Après lavage au TBS 1 X, les lames sont saturées, puis incubées avec l'anticorps primaire anti-hMMP-9 (ab58803, 1/300), toute la nuit, en chambre humide et à température ambiante. Les coupes sont lavées deux fois au TBS Tween 1 % (2 x 10 minutes). Un kit contenant l'anticorps secondaire est alors appliqué en chambre humide pendant 30 minutes (ImmPRESS peroxydase Reagent kit, anticorps de lapin anti-souris, ImmPRESS, Vector®).

Les coupes sont révélées à l'AEC (3-amino-9-EthylCarbazole, Peroxidase substrate kit, SK-4200, Vector®) pendant 15 minutes et contre-colorées à l'hématoxyline. Après un montage à l'eau des coupes, l'immunoréactivité est explorée au niveau du cytoplasme, de la membrane et de la matrice extracellulaire.

2.2.1.2. Radiomarquage sur coupes

Le radiomarquage est effectué sur chaque coupe adjacente de la coupe préalablement analysée en immunohistochimie. Les lames sont préparées comme précédemment, c'est-à-dire exposées à deux bains de xylène (5 et 3 minutes), puis réhydratées (alcool 100°, 95°, 70°, 2 x 5 minutes) et enfin rincées à l'eau (2 x 5 minutes). Les coupes sont ensuite incubées durant 60 minutes en présence à température ambiante, soit de l'¹¹¹In-DOTA-F3B, soit de la solution d'¹¹¹In-DOTA-contrôle (15 kBq/40 µL). Le radioligand libre est éliminé par des bains de PBS-Tween 0,05 % (2 x 5 minutes), puis d'eau distillée (2 x 5 minutes). La radioactivité fixée sur les coupes est enfin visualisée et quantifiée au β -imageur 2000 (Biospace Lab) et au micro-imageur (μ IMAGER™, Biospace Lab).

2.2.2. Résultats

2.2.2.1. Analyse immunohistochimique sur coupes de tumeurs

L'expression de la métalloprotéase matricielle 9 a été explorée sur de nombreuses coupes de mélanomes. Des lames de peau saine sont utilisées comme témoin négatif. L'anticorps ab58803, anti-hMMP-9 (Abcam) est capable de cibler la forme active de l'enzyme (hMMP9, 83 kDa), comme la pro-enzyme (pro-hMMP-9, 92 kDa). L'étude immunohistochimique témoigne de la surexpression de la MMP-9 lors de mélanomes.

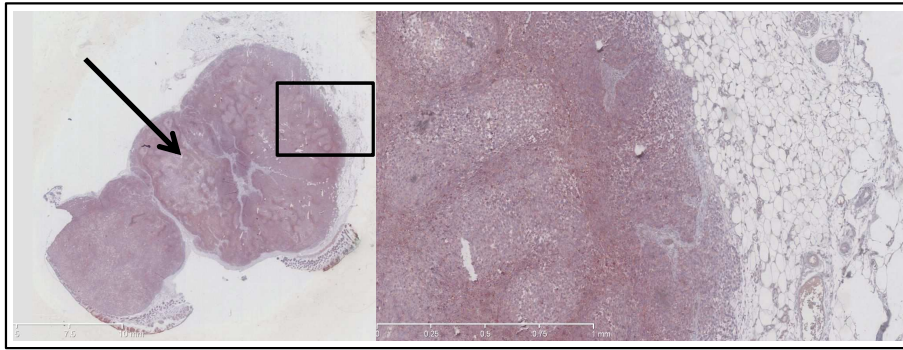


Figure 48 : Détection de la MMP-9 sur coupes de mélanome A375. Des zones de nécrose de coloration plus claires sont visibles

La mise au point de la technique sur lames de tumeurs mélaniques A375 permet d'aboutir à un marquage spécifique et cytoplasmique. La fixation est homogène sauf au niveau des zones de nécrose, qui apparaissent plus claires (**Figure 48**).

n°	Type mélanome	AJCC 2009	Stade	Ulcération	Clark	Mitose/ mm ²	Breslow (mm)	Ganglio n/méta	IRS MMP-9
1	nodulaire	pT4bN3M0	IIIc	oui	V	9	7	3	6
2	SSM	pT1b	Ib	non	III	1	0,65		6
3	ALM	pT1a	Ib	non	IV	1	1		6
4	Dubreuilh	pT1a	Ia	non	II	0	0,5		6
5	ALM	> pT1b (pT3b)	IIb	oui		4	>1,875		6
6	ALM	pT3b	IIb	oui	IV	8	3,6		6
7	nodulaire	pT4b	IIIb ou IIIc	oui	IV	20	11	3	6
8	nodulaire	pT4bpN3M1a	IV	oui	IV	16	7		3
9	Dubreuilh	pT1a	Ia	non		0	0,6		6
10	Dubreuilh	pT1b	Ib	non	IV	2	0,96		6
11	métastase								3
12	nodulaire	pT4a	IIIb	non	IV	3	8	3 en transit	3
13	métastase / ganglion								6
14	ganglion								6
15	ganglion								6
16	ALM	pT1a	Ib	oui		1	1,9		6
17	Dubreuilh	pT1a	Ia	non	II	0	0,3		6
18	SSM	pTIIa	IIa	oui	IV	5	1,9		6
19	SSM	pT1b	Ib	non	IV	2	0,8		6
20	SSM	pT4b	IV	oui	IV	6	6		6

Tableau 3 : Description et résultats IRS des différents types de mélanomes étudiés

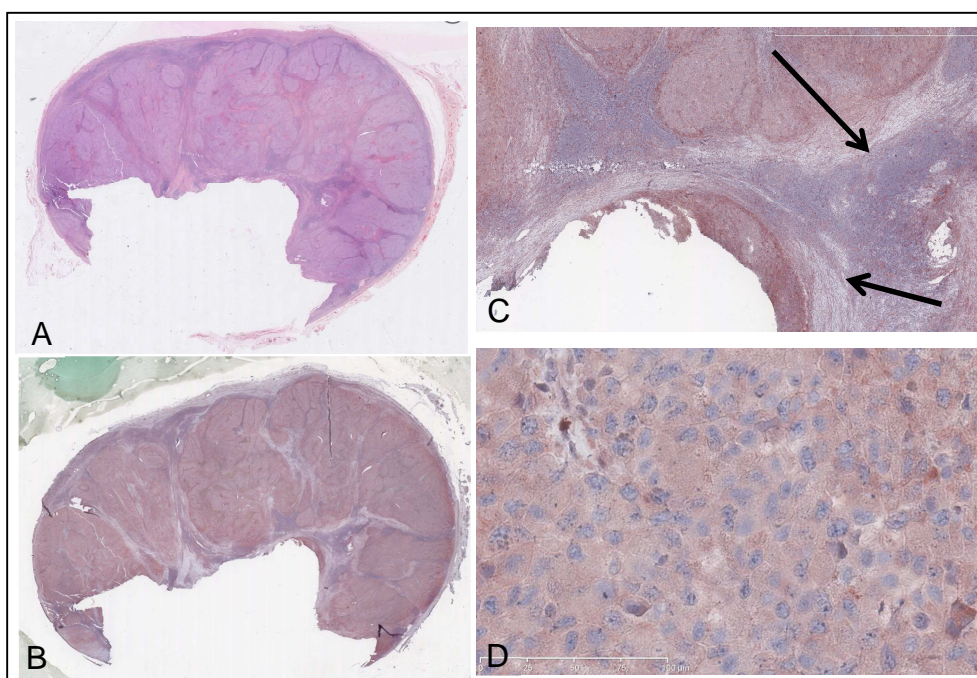


Figure 49 : Immunohistochimie d'un ganglion essentiellement métastatique, peu de parenchyme ganglionnaire résiduel. (A) Coloration HES (hématéine Eosine Safran), (B - D) Détection de la MMP-9, marquage cytoplasmique (D), spécifique (rouge) avec les lymphocytes (bleus) et le tissu conjonctif (gris) négatifs (C)

L'étude de l'expression de la métalloprotéase est ensuite appliquée aux différents types de mélanomes présentés dans le tableau 3 (**Figure 49 - 52**). Le calcul du score IRS (Immuno Reactive Score) est effectué sur les résultats d'immunohistochimie des différents types et différents grades de mélanomes (SSM, ALM, de Dubreuilh, nodulaires et métastases/ganglion) (**Tableau 4**).

<i>Pourcentage de cellules marquées</i>	<i>Intensité de marquage</i>	<i>Score IRS (0 - 9)</i>	<i>Classification</i>
0 : pas de cellules positives	0 : pas de coloration	0 - 1 : négatif	0 - 3 : expression faible
1 : < 10 % de cellules positives	1 : coloration faible	2 - 3 : faible	
2 : 10 - 49 % de cellules positives	2 : coloration modérée	4 : modéré	≥ 4 : expression forte
3 : 50 - 100 % de cellules positives	3 : coloration intense	≥ 6 : fortement positif	

Tableau 4 : Immunoréactivité et classification IRS (Immuno Reactive Score)

Les résultats obtenus confirment les marquages précédents sur lames A375. La fixation de l'anticorps est à nouveau homogène, et intracytoplasmique du fait de l'absence de signal au niveau des espaces intercellulaires (**Figure 49, D**). L'expression de la hMMP-9 est aussi retrouvée au niveau du cytoplasme des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins

dans l'environnement tumoral (**Figure 50 F**). L'analyse immunohistochimique présentée en figure 50 montre une forte expression de la hMMP-9 au sein de ce ganglion entièrement métastatique, alors qu'une absence de réactivité est observée dans le tissu conjonctif et les cellules lymphocytaires saines.

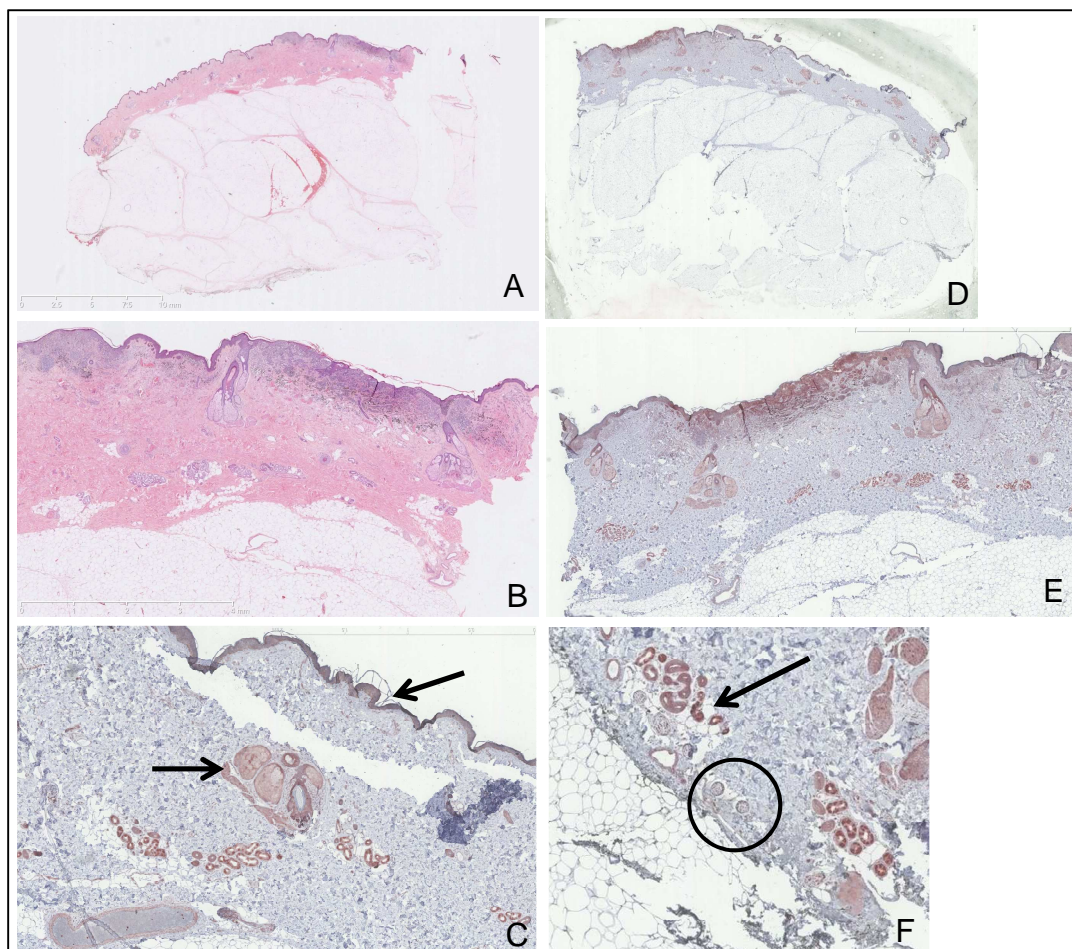


Figure 50 : Mélanome SSM : (A, B) Coloration HES, (C - F) marquage positif de l'anticorps ciblant la MMP-9 au niveau des vaisseaux (C, F, flèche) et des glandes sébacées. Les noyaux des adipocytes semblent également positifs. Les nerfs ne présentent pas de fixation de l'anticorps (F, cercle)

Toutefois, l'expression ne semble pas corrélée au grade de la pathologie. Le score IRS est équivalent quel que soit le type et le grade de la tumeur. L'immunofixation de la hMMP-9 est variable, mais peut-être systématiquement observée sur chaque type de tissu étudié (mélanome SSM (pT1b), mélanome ALM (pT1a), mélanome nodulaire (pT4N3M1), ganglion/métastase). Cette identification de la métalloprotéase est plus facile en cas de tumeur infiltrante. De plus, un bruit de fond réactionnel est à noter. Non négligeable, il altère la qualité de la détection, avec des fixations au niveau de l'épiderme et des glandes sébacées (**Figure 50, C**). Cette fixation « parasite » complique l'identification et la délimitation des

tumeurs lorsqu'elles ne sont pas très invasives. Le marquage de l'épiderme est par ailleurs retrouvé sur des coupes saines de tissus inflammatoires et non inflammatoires.

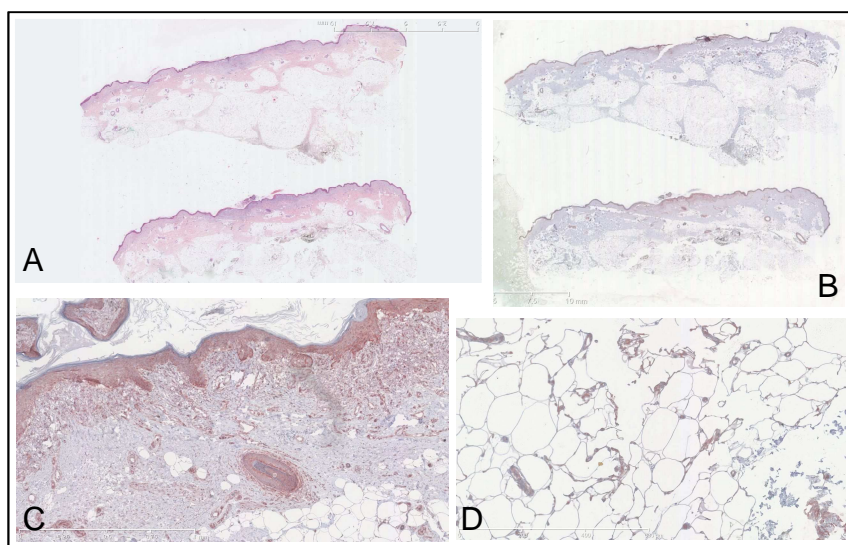


Figure 51 : Mélanome de Dubreuilh : (A) Coloration HES, (C - D) marquage positif avec l'anticorps ab58803. (B, C) Mélanome devenu intra-épidermique car régression sous-jacente. Mélanocytes tumoraux différenciables des kératinocytes. (D) Marquage nucléaire des adipocytes

Des tests comparatifs ont été pratiqués en utilisant l'anticorps LM609 anti-intégrine $\alpha_v\beta_3$ humaine. Une co-localisation des fixations a pu être observée, même si l'intensité de la fixation de l'anticorps LM609 est plus faible. Pour cette étude, la technique d'identification de l'intégrine utilisée a été modifiée par rapport au protocole précédemment décrit. En effet, la dilution de l'anticorps primaire est réalisée à l'aide de sérum de cheval, l'anticorps secondaire est apporté par le kit ImmPRESS (Vector®), et enfin la révélation est effectuée avec de la DAB (3,3'-DiAminoBenzidine) fraîchement reconstituée (**Annexe 5**).

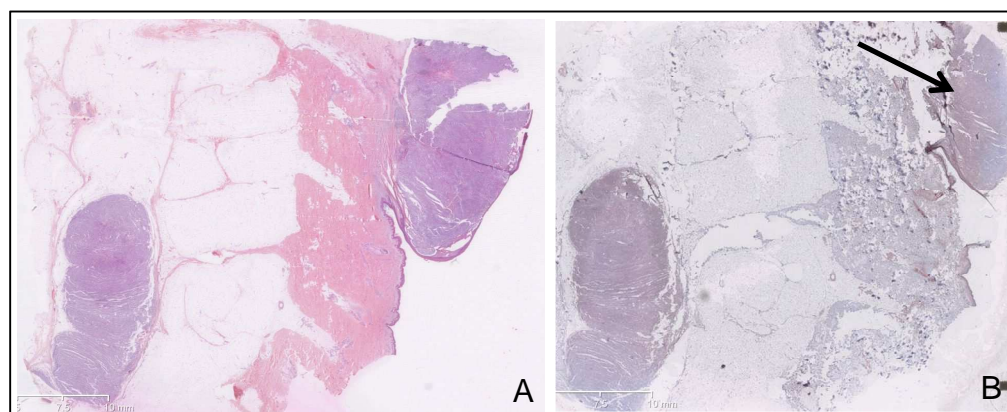


Figure 52 : Mélanome nodulaire : (A) Coloration HES, (B) Détection de la MMP-9 au niveau du mélanome nodulaire primitif et d'un nodule en transit dans l'hypoderme

2.2.2.2. Radiomarquage sur coupes

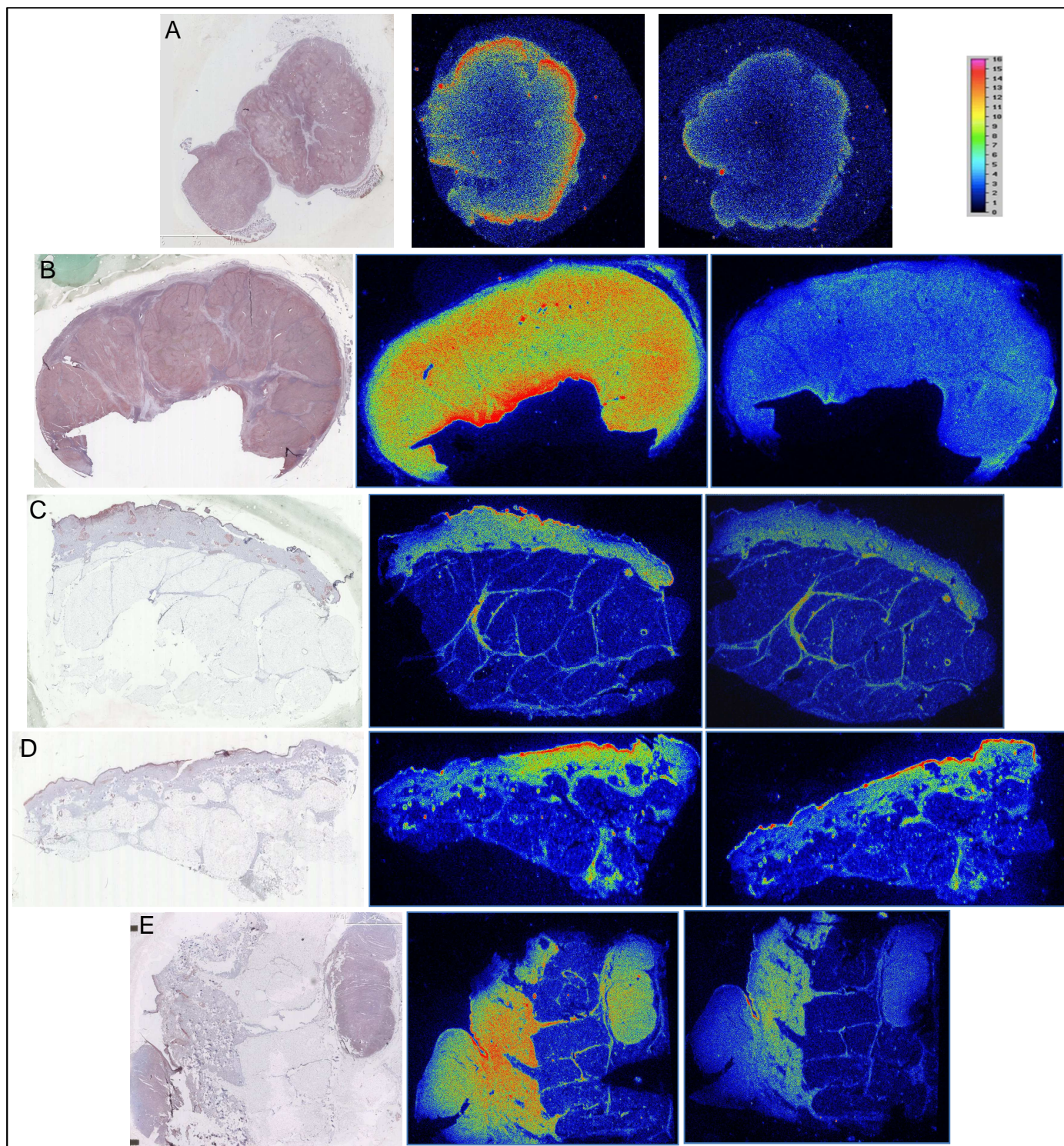


Figure 53 : Comparaison des résultats obtenus entre l'immunohistochimie (anticorps ab58803 anti-MMP-9) et les radiomarquages à l' ^{111}In -DOTA-F3B et ^{111}In -DOTA-Ctl sur coupes de mélanomes. (A) mélanome A375, (B) ganglion métastatique, (C) mélanome SSM, (D) mélanome de Dubreuilh, (E) mélanome nodulaire. On observe une co-localisation entre l'immunohistochimie et le radiotracer. L'intensité de fixation du ^{111}In -DOTA-F3B est supérieure au contrôle

Le radiomarquage des coupes adjacentes à l' ^{111}In -DOTA-F3B présente des résultats similaires à ceux précédemment obtenus en immunohistochimie (**Figure 53**). Ceci tend à confirmer la spécificité du ciblage de notre radiotraceur. La localisation et l'intensité de la fixation semblent correspondre à celles de l'anticorps. Le radiomarquage périphérique des lames A375 est vraisemblablement à relier aux zones de nécrose en position centrale. Comme en immunohistochimie, le signal le plus important est celui des coupes de métastases/ganglions. L'aptamère induit un radiomarquage nettement supérieur à ce qu'il est possible de visualiser avec le contrôle. Cette différence est plus faible pour les tumeurs de bas grade.

Ex Vivo and in Vivo Imaging and Biodistribution of Aptamers Targeting the Human Matrix MetalloProtease-9 in Melanomas

David Kryza^{1,2*}, Frédéric Debordeaux^{3,4}, Laurent Azéma^{5,6}, Aref Hassan^{5,6}, Olivier Paurelle^{5,6}, Jorgen Schulz^{3,4}, Catherine Savona-Baron^{3,4}, Elsa Charignon¹, Pauline Bonazza¹, Jacqueline Taleb¹, Philippe Fernandez^{3,4}, Marc Janier^{1,2¶} and Jean Jacques Toulmé^{5,6¶}.

¹ ILM UMR 5306 CNRS - Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

² Hospices Civils de Lyon, Lyon, France

³ CNRS, INCIA, UMR 5287, Talence, France

⁴ Service de Médecine Nucléaire, CHU de Bordeaux, Bordeaux, France

⁵ Inserm U869, Bordeaux, France

⁶ University of Bordeaux, ARNA Laboratory, Bordeaux, France

***Corresponding author:**

E-mail: david.kryza@chu-lyon.fr

[¶] Should be considered as co-director.

Abstract

The human Matrix MetalloProtease-9 (hMMP-9) is overexpressed in tumors where it promotes the release of cancer cells thus contributing to tumor metastasis. We raised aptamers against hMMP-9, which constitutes a validated marker of malignant tumors, in order to design probes for imaging tumors in human beings. A chemically modified RNA aptamer (F3B), fully resistant to nucleases was previously described. This compound was subsequently used for the preparation of F3B-Cy5, F3B-S-acetylmercaptoacetyltriglycine (MAG) and F3B-DOTA. The binding properties of these derivatives were determined by surface plasmon resonance. Optical fluorescence imaging confirmed the binding to hMMP-9 in A375 melanoma bearing mice. Quantitative biodistribution studies were performed at 30 min, 1h and 2 h post injection of ^{99m}Tc -MAG-aptamer and ^{111}In -DOTA-F3B. ^{99m}Tc radiolabeled aptamer specifically detected hMMP-9 in A375 melanoma tumors but accumulation in digestive tract was very high. Following i.v. injection of ^{111}In -DOTA-F3B, high level of radioactivity was observed in kidneys and bladder but digestive tract uptake was very limited. Tumor uptake was significantly (student *t* test, $p < 0.05$) higher for ^{111}In -DOTA-F3B with 2.0 %ID/g than for the ^{111}In -DOTA-control oligonucleotide (0.7 %ID/g) with tumor to muscle ratio of 4.0. Such difference in tumor accumulation has been confirmed by *ex vivo* scintigraphic images performed at 1h post injection and by autoradiography, which revealed the overexpression of hMMP-9 in sections of human melanomas. These results demonstrate that F3B aptamer is of interest for detecting hMMP-9 in melanoma tumor.

Key words: MMP-9, aptamer, melanoma, extracellular matrix.

Introduction

Among oncological physiopathologic processes, angiogenesis appears to be a promising way for targeted therapies [1]. In this process, matrix metalloproteinases (MMP) are one of main actors of degradation of the extracellular matrix and basement membrane, facilitating tumor cell invasion [2]. Among them, MMP-9 is over-expressed in numerous malignant tumors [3] and particularly in cutaneous malignant melanoma[4-5].

Malignant melanoma is a tumor that arises from melanocytic cells and primarily involves the skin but it can also arise in the eye, meninges and on various mucosal surfaces. It can metastasize either by the lymphatic or haematogenous way. Distant metastases have a poor prognosis with no long-term curative treatment [6] and with a median survival in untreated patients being only 6–9 months. Efficient and accurate diagnosis is highly needed for this pathology. In high-risk patients, computerized tomography with or without FDG-positron emission tomography (FDG-PET) and magnetic resonance imaging may be indicated depending on the clinical findings. Nevertheless, those techniques lack specificity with relatively high false-positive rate and a low sensitivity for the detection of occult regional nodal metastases. Molecular imaging techniques, using specific target marker, are needed for *in vivo* mapping and measuring pathological processes at cellular or even molecular levels.

Developed in the early 1990s [7-9], aptamers are three-dimensional oligonucleotides, either with a deoxy- (DNA) or a ribo-scaffold (RNA). They bind with high affinity and high specificity to a large variety of targets ranging from small organic molecules to viruses and live cells [10-12], by interaction optimized by shape complementarity. Aptamers are generated by an iterative process of *in vitro* selection and amplification called SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment) [13] and can be chemically-modified thus generating powerful tools for biomedical applications [14]. Particular interest is

being paid to aptamers obtained by cell-SELEX, recognizing membrane proteins and receptors [15-17]. A number of reports describe aptamers specific of tumor markers [18-19]. Such aptamers are used for many different purposes such as biosensing [20], delivery [21-22], flow-cytometry [23], diagnostics [24-25] and therapeutics [21, 26]. The binding characteristics of aptamers, namely high affinity and specific recognition of the target as well as their easy of synthesis made them excellent candidates for imaging. Aptamer-based probes have been engineered for monitoring several tumor markers: nucleolin [27], tenascin [28], PSMA [29], PTK7 or MUC1 glycoprotein [30-31], annexin A2 [32] or MMP-9 [33]. The versatility of oligonucleotide synthesis allows the chemical modifications of aptamers at defined positions without effect on their binding properties. Indeed different imaging modalities were implemented with aptamer probes: Magnetic Resonance Imaging (MRI) [34], optical imaging [30; 35] or nuclear imaging probe [36-37]. Promising results are available notably for the *in vivo* detection in animal models of tenascin [28], nucleolin [27] or MUC1 glycoprotein [31].

The F3B aptamer that we previously raised against the human MMP-9 exhibits the desired properties for an imaging agent: affinity in the low nanomolar range, high specificity of binding and full nuclease resistance due to a chemically modified backbone [33]. We previously demonstrated its interest for *ex vivo* imaging sections of human brain without any further *in vivo* evaluation. In the present study, we evaluated the *ex vivo* and *in vivo* melanoma tumor targeting efficiency of F3B towards hMMP-9 protein using a fluorescent or isotope labelled aptamer.

Materials and Methods

Oligonucleotide Synthesis

F3B and the control sequence, bearing a 5' hexylamino function, were synthesized on a 1 μ mol scale with an ABI Expedite 8909 synthesizer, using conventional β -cyanoethyl phosphoramidite chemistry (2'OMe-purine and 2'F-pyrimidine). Once purified (electrophoresis on denaturing gels: 20 % (19:1 acrylamide/bis-acrylamide), 7M urea, Tris-Borate-EDTA buffer), oligonucleotides were conjugated to DOTA or Cy5, according to a previously described protocol for MAG₃ coupling [33]. Briefly, 20 nmol of oligonucleotide were suspended in 100 μ L of binding buffer (sodium bicarbonate/sodium carbonate 0.25 M, pH 8.3, sodium chloride 1 M, sodium ethylenediaminetetraacetate 1 mM) and gently stirred at room temperature. DOTA-NHS (Chematech®) or Cy5-NHS (Interchim®) (3 mg, in 30 μ L of DMF) was added in portions at room temperature over 3 h. After complete addition, the suspension was stirred for an additional hour, and the crude was directly purified by HPLC (Macherey-Nagel Nucleodur column, 0.1 M triethylammonium acetate, pH 7.0, (acetonitrile/0.1 M triethylammonium acetate, pH 7.0: 80/20) gradient) to afford the oligonucleotide conjugates in 50–90% yield. Conjugate characterization was performed through MALDI-ToF mass spectrometry (Reflex III, Bruker) or Electrospray ionization (LCT Premier, Waters).

Protein.

The human MMP-9 was purchased from Calbiochem; samples were checked for purity by SDS polyacrylamide gel electrophoresis.

Specificity Assays

The specificity of F3B-DOTA and F3B-Cy5 derivatives for hMMP-9 was determined through competition with the F3B unmodified aptamer monitored by surface plasmon resonance (BiaCore 3000 apparatus, BiaCore AB, Sweden). 5'-biotin F3B and its control were immobilized on a Xantec™ SAD 200m chip (50 µL of 50 nM solution in PBS buffer, at a rate of 20 µL/min). hMMP-9 (50 nM in PBS buffer) was incubated with F3B or with the control labelled derivatives (200 nM in PBS buffer) and injected on chip (80 µL, 20 µL/min) at 23°C. The complexes were dissociated with a pulse of a solution containing 40% formamide/3.6 M urea/30 mM EDTA.

Oligonucleotide sequences

2'OMe-R; 2'F-Y; X= hexylamino phosphate; Y = hexaethyleneglycol phosphate

F3Bomf-NH₂. 5'-XY UGC CCU GCC CUC ACC CGU UAG CCU GAG CGC CCC GCA-3'

Control-NH₂. 5'-XY UGC CAA ACG CGU CCC CUU UGC CCG GCC UCC GCC GCA-3'

Oligonucleotides Radiolabelling

Technetium 99m labelling

F3B-MAG3-aptamer and MAG3-control-sequence were labelled by modifying an existing protocol. Briefly, the oligonucleotides (20 µg) were dissolved in phosphate buffer saline (PBS, 20 µL) in a sterile vial. Then 20 µL of a mixture of sodium tartrate (50 mg/mL) in sterile 0.5 M sodium bicarbonate, 0.18 M ammonium hydroxide, 0.25 M ammonium acetate were added to the vial following by immediately adding 2 µL of a freshly prepared SnCl₂.2H₂O solution in HCl 0.1 N (1 mg.mL⁻¹). ^{99m}TcO₄⁻ was eluted as a physiological saline solution from a commercial ⁹⁹Mo/^{99m}Tc generator obtained from Cisbio-international (Saclay, France). 74 MBq of ^{99m}TcO₄⁻ was then added to the mixture, which was incubated 20 min at

room temperature. The radiolabeling mixture was then purified from radiochemical impurities by steric exclusion chromatography through a PD-10 column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Uppsala, Sweden) as follows. The column was first washed with 15 mL of isotonic saline and the mixture solution was then loaded on the column followed by elution with isotonic saline. The radiochemical purity (RCP) was assayed with a gamma isotope TLC analyzer (Raytest, Courbevoie, France) using ITLC-SG (Biodex Tec-control black, Biodex, NY, USA) and methylethylcetone (MEK) as mobile phase. Finally, the fractions with the highest radiochemical purities were pooled.

Indium 111 labelling

F3B-DOTA-aptamer and DOTA-control-sequence (20 µg) were labelled by adding 300 µL of acetate buffer 0.1 M pH5 and 30-70 MBq of high purity ^{111}In -chloride at room temperature for 45 min. Free indium 111 was removed using a PD-10 column. The column was first washed with 15 mL of acetate buffer 0.1 M, then the labelled mixture was loaded on the column and eluted using acetate buffer. ^{111}In -DOTA-F3B or ^{111}In -DOTA-control were first eluted. RCP of each 0.5 mL fraction was evaluated using ITLC-SG (biodex, Tec-control black) and citrate buffer 50 mM (pH 5) as mobile phase. ^{111}In -DOTA-F3B or control remained at the origin whereas unbound indium 111 migrated with an Rf of 0.9-1. The highest radiochemical purity fractions were pooled.

Stability testing

For stability testing, an aliquot of the purified $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG3-F3B, ^{111}In -DOTA-F3B and labelled control-aptamer were incubated at 37 °C in 2 mL phosphate buffer saline (pH 7.4) and radiochemical purity was evaluated as described above.

Biodistribution studies

Biodistribution studies were performed in compliance with the French guidelines and Ethics approval was obtained from the local animal committee of University Claude Bernard Lyon 1. Mice were obtained from Janvier labs (Saint-Berthevin, France). All animals were housed under standard environmental conditions at ambient temperature of 25°C and cared with free access to water and food. For all experiments, mice were anaesthetized using a gaseous protocol (isoflurane / oxygen (2.5%/2.5%). Melanoma bearing mice were obtained by subcutaneous injection of 3.10^5 cells of human malignant melanoma A375 in the right flank or in the paw of nude mice (6-8 weeks old, 20-25g).

Quantitative biodistribution studies

1 to 10 MBq of radiolabelled aptamer in a maximum volume of 100 µL were intravenously injected into mice bearing human melanoma tumors (n=3 or 4 for each groups). Mice were sacrificed at defined time points: 30 min, 2 and 4 h after injection by cervical dislocation. Tissues of interest (blood, heart, lungs, spleen, kidneys, muscles, brain, and skin) were removed, weighted and radioactivity was counted for 5 min in a gamma scintillation counter (Wizard® gamma counter, Perkin Elmer, USA). Urine and feces were collected thanks to individual metabolic cage for housing animals and counts. Tissue distribution was expressed as the percentage of injected dose per gram (%ID/g). Renal and hepatobiliary elimination were expressed as cumulated radioactivity under total injected activity. Tumor to muscle ratio (TMR) was calculated using the following formula: (%ID/g tumor) / (%ID/g muscle).

Blood half-life of radiolabeled aptamer

After i.v. injection of 1-2 MBq of radiolabeled aptamer, blood samples were removed at different time intervals : 2 min, 5 min, 10 min, 15 min, 30 min and 1 hour and were weighted

and counted for 5 min in a gamma counter. Data points were fitted to an exponential decay function.

Imaging protocol

Ex vivo planar scintigraphic imaging was performed on posterior paw being removed and positioned over the collimator of a dedicated small animal Nano-SPECT-CT system (BIOSCANTM, Washington DC, USA) at 1 hour after i.v. injection of radiolabeled ¹¹¹In-aptamer. The acquisition was performed during 10 minutes with two 15% windows centered on the two peaks 171 keV and 245 keV of indium 111.

***In vivo* and *ex vivo* fluorescence imaging**

Optical imaging was performed thanks to a back-thinned CCD-cooled camera (ORCAIIBT-512G, Hamamatsu photonics, Massy, France) using a colored glass long-pass RG 665 filter (Melles Griot, Voisins les Bretonneaux, France), which cuts off all excitation light. Dorsal images were acquired 1h after i.v. injection of 100 µL of Cy5-F3B-aptamer or Cy5-control-sequence (1 to 5 nmol) into mice bearing human melanoma tumors. Mice were sacrificed at 1h post injection and tissues of interest (kidneys, liver, brain, spleen, heart, lungs bone, skin muscle, digestive tract and tumor) were imaged.

Immunohistochemical analysis

Patients samples used in these studies were obtained after informed consent in accordance with the Declaration of Helsinki and stored at the “CRB Cancer des Hôpitaux de Toulouse” collection. According to the French law, CRB Cancer collection has been declared to the Ministry of Higher Education and Research (DC-2008-463) and a transfer agreement (AC-2008-820) was obtained after approbation by ethical committees. Clinical and biological

annotations of the samples have been declared to the CNIL (Comité National Informatique et Libertés).

Different types of well-characterized tumors were formalin-fixed and paraffin-embedded (Single Spread Melanoma, Nodular Melanoma, Acral lentiginous melanoma, Lentigo Malignant Melanoma (Dubreuilh's melanoma), nodes/metastases). Immunohistochemical hMMP-9 detection was performed on serial sections in order to validate radiolabeling analysis, using a purified anti-hMMP-9 mouse monoclonal antibody (ab58803, Abcam). Appropriate positive and negative controls omitting the primary antibody have been included with every slide run.

Representative paraffin embedded 5 µm thick sections were dewaxed with xylene, rehydrated through a graded alcohol series, and washed with distilled water. A blocking step is needed in order to block endogenous peroxidase activity. Moreover, antigen-unmasking procedure was applied to achieve optimum staining.

After washing with TBS, the slides were saturated, and then incubated with the hMMP-9 antibody (ab58803, 1:300) overnight in humidified atmosphere at room temperature. Sections were washed twice with TBS tween 1%, and ImmPRESS peroxidase Reagent kit (rabbit anti-mouse antibody, ImmPRESS™, Vector®) was then applied as the secondary antibody in moist chamber for 30 min. Tissue sections were stained with AEC (3-Amino-9-EthylCarbazole, ab 64252, Abcam, Cambridge) for 15 min and counterstained with hematoxylin for examination. Immunoreactivity was evaluated in the cell cytoplasm, cytoplasmic membrane, and in the extracellular matrix.

Radiolabeling of tumor tissue sections

As for immunohistochemical analysis, binding studies were performed using tumor sections, but incubated in the presence of either ^{111}In -DOTA-F3B aptamer or ^{111}In -DOTA-control sequence. 5 μm thick slices were deparaffinised and prepared as previously described. These slices were incubated with ^{111}In -DOTA-F3B aptamer and adjacent section with ^{111}In -DOTA-control-sequence for 60 min at room temperature (15 kBq/40 μL). Unfixed radioligand was removed with PBS-Tween 0.05 % and slices were washed in distilled water. Radioactivity was finally evaluated using a micro-imager 2000 (Biospace Mesures, Paris, France).

Results

Characteristics of hMMP-9 aptamer and SPR results

The solid phase synthesis of oligonucleotides allows the controlled incorporation of appending group anywhere into the aptamer sequence through phosphoramidite chemistry. We opted for the 5' modification of aptamer, with the display of a reactive amino group, used for conjugation with N-hydroxysuccinimide ester activated labels. This amine function is away from the oligonucleotide part through the incorporation during synthesis of various spacers: a dimer of 2'deoxy-thymidine or a hexaethyleneglycol group. The first spacer was used in the case of cyanine-5 incorporation, whereas the second spacer was used for DOTA ligation. Beside biodistribution modulation problems, we had to firstly confirm that 5' appending groups are not disrupting the F3B-MMP-9 complex formation efficiency. For this purpose, we settled a competition assay, monitored by surface plasmon resonance. Results are reported on Fig 1. A biotinylated F3B variant was loaded on the streptavidin sensor chip. This variant was able to detect its target at a usual K_D of 10 nM. The pre-incubation of the protein (50 nM) with F3B labelled either with cyanine-5 or DOTA group (200 nM) led to the abolition of complex formation on sensor chip. This result was not

observed when the control oligonucleotide was used for pre-incubation. It confirms that variants, F3B-Cy5 and F3B-DOTA, preserve three-dimensional features of the aptamer and that the appending groups doesn't interfere with the recognition region.

Fig 1. F3B-biotine was immobilized on streptavidin chip. MMP-9 (50 nM) was injected at $20 \mu\text{L}.\text{mn}^{-1}$ alone (solid lines) or after pre-incubation with control conjugates (200 nM, dashed lines) or F3B conjugates (200 nM, dot lines). Pre-incubation with control conjugates (left panel: Cy5, right panel: DOTA) did not abolish complex formation. Whereas pre-incubation with F3B conjugates (left panel: Cy5, right panel: DOTA) led to complex abolition.

Radiolabelling and stability

After steric exclusion chromatography purification, radiolabeled aptamer were obtained with radiochemical purity (RCP) exceeding 98% and 96% for technetium 99m and indium 111 respectively. Radiochemical yields were 70% for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG-aptamer and 15-20% for ^{111}In -DOTA-aptamer. For both radionuclides at 4 hours after incubation at 37°C in phosphate buffer saline pH 7.4, RCP purity was still greater than 95% indicating a suitable kinetic stability to perform *in vitro* and *in vivo* experiments.

Biodistribution of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ - MAG-F3B and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG-control

Biodistribution studies were performed in A375 melanoma bearing mice at 30 min, 1 h and 2 h post injection of radiolabeled oligonucleotides and are presented in Fig 2. After i.v. injection of $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -aptamer, high level of radioactivity were observed in kidneys and bladder with more than $48.0 \pm 8.8 \%$ ID and $60.6 \pm 7.7\%$ ID eliminated through renal excretion for $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG-F3B and $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -MAG-control, respectively. High levels of radioactivity were also observed in digestive tract and liver with value of $7.7 \pm 1.6 \%$ ID/g and $13.5 \pm 1.6 \%$ ID/g at 30 min post

injection and 24.4 ± 8.0 %ID/g and 5.75 ± 2.7 %ID/g at 2h post injection for ^{99m}Tc -MAG-F3B compared to 7.5 ± 3.6 %ID/g and 12.5 ± 1.7 %ID/g at 30 min post injection and 18.5 ± 3.0 %ID/g and 6.0 ± 0.8 %ID/g at 2 h post injection for ^{99m}Tc -MAG-control indicating also an hepatobiliary clearance of the ^{99m}Tc -aptamers. No significant accumulation in other organs was observed for both ^{99m}Tc -oligonucleotides at any time. The highest tumor uptake was observed at 1h post injection for the aptamer derivatives with values of 1.8 ± 1.2 %ID/g which was significantly higher (Student *t* test, $P < 0.05$) than for the control ones (0.15 ± 0.03 %ID/g). The tumor to muscle ratio (TMR) value for ^{99m}Tc -MAG-F3B was 7.6 at 1h post injection respectively compared to 4.4 for the ^{99m}Tc -MAG-control.

Figure 2. Quantitative biodistribution of ^{99m}Tc -MAG-aptamer and ^{99m}Tc -MAG-control aptamer as function of post i.v. injection delay expressed as % of injected dose per gram of tissue.

Biodistribution of ^{111}In -DOTA-F3B and ^{111}In -DOTA-control

In order to evaluate the influence of the chelator on the aptamer biodistribution and the tumor targeting, biodistribution studies were performed at 30 min, 1 h and 2 h post injection of ^{111}In -DOTA-F3B and ^{111}In -DOTA-control. The results are presented in Fig 3. Both aptamers were rapidly cleared from the blood pool (average blood half-life: 11 min) and demonstrated low uptake in normal organs and tissues except from kidneys and liver. The uptake of radiolabeled DOTA aptamers in the digest tract was very low, with value of 0.9 ± 0.6 %ID/g and 0.7 ± 0.1 %ID/g at 30 min and 1 h post injection, respectively for ^{111}In -DOTA-F3B and 0.6 ± 0.2 %ID/g and 0.6 ± 0.2 %ID/g for ^{111}In -DOTA-control at 30 min and 1 h post injection, respectively. Tumor uptake was significantly (student *t* test, $p < 0.05$) higher for ^{111}In -DOTA-F3B with values of 2.0 ± 1.1 %ID/g at 1 h post injection than for the ^{111}In -DOTA-control (0.7

± 0.2 %ID/g). TMR were 4.0 at 1 h post injection for ^{111}In -DOTA-F3B and 0.3 for ^{111}In -DOTA-control, respectively.

Fig 3. Quantitative biodistribution of ^{111}In -DOTA-F3B-aptamer and ^{111}In -DOTA-control-aptamer as function of post i.v. injection delay expressed as % of injected dose per gram of tissue

Imaging studies

In vivo fluorescent images acquired 1 h after i.v. injection of Cy5-F3B or Cy5-control-sequence into mice bearing human melanoma tumors are presented in Fig 4. Fluorescence staining allowed visualizing the kidneys and the liver and identifying the tumor with Cy5-F3B. Fluorescence imaging of the dissected organs and tumor tissues acquired 1 h after i.v. injection of Cy5-F3B-aptamer revealed well the highest fluorescent organs (i.e.: liver and kidneys) and revealed a moderate signal in the tumor. Such difference in tumor accumulation between F3B and its control has been confirmed by *ex vivo* scintigraphic images performed at 1 h post injection (Fig 5).

Fig 4.

(A) Ventral planar fluorescence reflectance images acquired at 1h post injection of Cy5-F3B-aptamer (1, 2) or Cy5-control-sequence (3) into mice bearing human melanoma tumors.

(B) Fluorescence reflectance imaging of organs after dissection of mice 2.

Fig 5.

Ex vivo scintigraphic planar image of posterior paw at 1h after i. v. injection of ^{111}In -DOTA-F3B-aptamer and ^{111}In -DOTA-control-aptamer.

Immunohistochemistry and autoradiography

MMP-9 expression was first investigated in several human tumors from skin by immunohistochemistry using a specific hMMP-9 antibody. Healthy skin was used as MMP-9 negative control. The antibody was able to target active hMMP-9 (83 kDa) and pro-hMMP-9 (92 kDa). Immunohistochemical study revealed that hMMP-9 was overexpressed in melanomas. Strong reactivity was mainly observed in the cytoplasm of numerous tumor cells (Fig 6E). Immunopositivity was also present in the endothelial cells of blood vessels in the tumor environment and disturbing background was also observed in epidermis and in sebaceous glands (Fig 6D). As shown in Fig 6, the hMMP-9 expression, monitored by immunohistochemical analysis, showed an important staining in metastasis nodes whereas no immunoreactivity was detected either in conjunctive tissue or in healthy lymphocytes.

For the others primary tumors explored (superficial spread melanoma (pT1b), lentiginous malignant melanoma (pT1a), nodular melanoma (pT4b,N3M1), nodes/metastases), hMMP-9 immunostaining showed a variable but positive expression and the observation was easier in case of infiltrative tumors. The labelling of the adjacent slices of melanoma using ^{111}In -DOTA-F3B or control aptamer tended to confirm the results previously obtained in immunostaining. Micro-imager analysis showed a fair agreement with the interaction of the hMMP-9 monoclonal antibody. The radiolabeled ^{111}In -DOTA-F3B aptamer induced a strong signal compare to ^{111}In -DOTA-control (Fig 7). One can notice that the difference was weaker for low-grade melanomas. Moreover, in accordance with immunohistochemical analysis, the highest signal was obtained with nodes/metastases. The merger of the obtained images revealed a good colocalization on this sample of nodular melanoma between the binding of the anti-hMMP-9 antibody and the labeling of the tracer (Fig 8). So binding intensities seemed to well correlate with the amount of hMMP-9 detected by immunohistochemistry.

Fig 6. Immunostaining using anti-hMMP-9 murine monoclonal antibody.

The antibody ab58803 localizing area of high expression of the integrin in respectively (A) Superficial Spread Melanoma, (B) Metastatic nodes, (C) Lentigo Malignant Melanoma. (D) Background in the immunohistochemical analysis of Superficial Spread Melanoma with staining of epidermis, endothelial cells and sebaceous glands. Immunohistochemical detection of hMMP-9 using ab58803 antibody in a mostly metastatic node, with specific cytoplasmic immunoreactivity in tumor cells (E) and negative results for conjunctive tissue and normal lymphocytes (F).

Fig 7.

Comparison of the results obtained by radiolabeling of representative tumor tissue sections with ^{111}In -DOTA-F3B aptamer (left image) and ^{111}In -DOTA-control sequence (right image). The difference of activity seems to increase in a tumor grade-dependent manner.

(A) Lentigo malignant melanoma, (B) Nodular melanoma, (C) Mostly metastatic node.

Fig 8.

(A) Immunostaining of nodular melanoma using anti-hMMP-9 murine monoclonal antibody ab58803. Radiolabeling of adjacent tissue sections of nodular melanoma with ^{111}In -F3B-DOTA (B), and ^{111}In -DOTA-control sequence (C). Comparison of the results obtained by radiolabeling with ^{111}In -DOTA-F3B and by immunostaining. The results of immunohistochemical images corresponded with area with high activity. (D) Immunostaining of nodular melanoma with ab58803 murin monoclonal antibody anti-human MMP-9. It's possible to identify the primitive nodular melanoma and an intrahypodermic node (E) Merged Images. (F) Radiolabeling with ^{111}In -DOTA-F3B.

Discussion

In the field of diagnostic imaging, aptamers have shown great promise as recognition units for tumor targeting [27; 29; 37]. Due to the advantage of their structure and properties (i.e. small size, non-immunogenic, similar binding affinity than antibodies), aptamers binds to their targets with high affinity and specificity. Up to date, limited studies have been performed for *in vivo* tumor targeting using an aptamer labelled with a SPECT radionuclide. In a previous study, our group has demonstrated that radiolabeled F3B aptamer was able to target *in vitro* hMMP-9 protein, a tumor biomarker over-expressed in numerous various malignant tumor. In this study, we go a step further trying to evaluate ~~ex vivo~~ and *in vivo* melanoma tumor targeting using fluorescent or isotope labelled specific aptamer directed against hMMP-9 protein.

Due to the instability of small oligonucleotides in biological fluids, a specific aptamer has been truncated down to 36 nucleotides by substitution of RNA residues by 2'-O-methyl derivatives to increase Rnase/nuclease resistance in order to be able to perform *in vivo* studies.

First of all, F3B-DOTA and F3B-Cy5 affinity to hMMP-9 were evaluated using surface plasmon resonance experiments. Functionalized aptamer remained able to bind to hMMP-9 and its pro-form with a strong avidity since competition experiments performed with unmodified aptamer F3Bonf immobilized on the chip in the presence of F3B-DOTA or F3B-Cy5 conjugates with MMP-9 lead to abolish the SPR signal. When optical tagged, the intravenous injection of Cy5-F3B-aptamer in mice bearing melanoma increased fluorescence signal inside the tumor. This demonstrates an active targeting to hMMP-9 since Cy5-control-sequence did not allow us to localize the tumor. However, since penetration of near infrared light in tissues is limited to a few centimeters [38] with low spatial resolution [39] and limited ability to perform *in vivo* quantitative biodistribution, precise biodistribution of

specific aptamer directed against hMMP9 and control aptamer was performed thanks to the immobilization of technetium 99m inside a chelate (MAG3). The use of technetium 99m isotope for radiolabeling aptamer has several advantage including a suitable half-life, appropriate gamma photon energy, availability and low cost. In this study, we efficiently labelled ^{99m}Tc -MAG3-aptamer with high radiochemical purity and yield. MAG3 chelator is of particular interest as a bifunctional technetium chelator because it allows forming stable ^{99m}TcO core efficiently and rapidly and reduces serum proteins binding [40]. Due to their small size, blood clearance of both aptamers was very fast with a rapid diffusion leading to a maximal tumor uptake of 1.8 %ID/g at 1h with a tumor to blood ratio of 9 for ^{99m}Tc -MAG-F3B-aptamer. Nevertheless, accumulation and retention in digestive tract at different time points of both ^{99m}Tc -MAG3-aptamer were very high (more than 18 %ID/g), as frequently observed in previous reports [37; 41]. This important uptake was probably due to the lipophilicity of the radiolabeled compounds [42]. In such context, the detection of melanoma tumor and their metastases would be particularly difficult in the digestive and abdominal region leading us to envisage the use of a more hydrophilic and anionic chelate (i.e. DOTA) which is able to complex a wide variety of imaging or therapeutic radiometals including indium 111 which could label DOTA at high radiochemical purity in mild condition. In contrast to ^{99m}Tc -MAG3-aptamer, the use of DOTA chelator conjugates to the aptamer decrease dramatically the digestive tract uptake (< 2% ID/g at any time points) for ^{111}In -DOTA-F3B aptamer and ^{111}In -DOTA-control-aptamer. The biodistribution study of ^{111}In -DOTA-F3B revealed a slightly tumor uptake at 30 min and 1h post injection compared to the ^{99m}Tc -MAG-F3B-aptamer. These results support previous works confirming that various chelators could significantly affect the *in vitro* and *in vivo* biodistribution of the radiolabeled target.

The highest A375 human melanoma tumor uptake of ^{111}In -DOTA-F3B aptamer compared to the ^{111}In -DOTA-control-sequence was confirmed *ex vivo* by autoradiography and by *scintigraphic images*. Nevertheless, even if human tumor cell lines transplants in athymic mice are widely used for evaluating the targeting efficiency of a potential probe, the murine xenograft model has some limitations for representing the physiopathology and many aspects of human real cancer. In such context, *ex vivo* imaging of human slice of various grade of melanoma tissues have been performed using ^{111}In -DOTA-aptamer and compared to hMMP-9 expression by immunostaining. This is an important step to obtain a preliminary indication of the relevant use of indium 111 labelled hMMP-9 aptamer on clinical neoplasms. First of all, our results confirmed the over expression of hMMP-9 in melanoma tumors and were well correlated with the binding intensities of ^{111}In -F3B-DOTA even if the anti-hMMP-9 antibody used for immunostaining was raised against the mouse MMP-9 with lower specificity compared to the aptamer F3Bomf. Moreover, hMMP-9 expression and ^{111}In -F3B-DOTA binding corroborated to the grade of malignancy whereas the radiolabeled control sequence induced a weaker signal confirming the binding specificity of ^{111}In -DOTA-F3B to its target. The presence of DOTA, which is known to be a strong chelator for a variety of beta- or alpha metals such as Lutetium 177, Yttrium 90 or Bismuth 213 allows us to envisage their use in radionuclide therapy. To reach this goal, we are currently investigating the use of a dendritic structure bearing 2 F3Bomf aptamer since our group has recently demonstrated [43] that multivalency on a single dendron structure could highly increase tumor targeting thanks to their cooperative effect [44].

Acknowledgements

This study - Imelapt - was supported by a public grant from the French Agence Nationale de la Recherche within the context of the Investments for the Future Program, referenced ANR-10-LABX-57 and named TRAIL.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Haubner R, Weber WA, Beer AJ, Vabulienė E, Reim D, Sarbia M et al. Noninvasive visualization of the activated $\alpha v \beta 3$ integrin in cancer patients by positron emission tomography and [^{18}F]Galacto-RGD. *PLoS* 2005; 2(3):e70.
2. Forget MA, Desrosiers RR, and Béliveau R. (1999). Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2005, 77:465–480.
3. Merdad A, Karim S, Schulten HJ, Dallol A, Buhmeida A, Al-Thubaity F et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer: MMP-9 as a potential biomarker for cancer invasion and metastasis. *Anticancer Res.* 2014; 34(3):1355-66.
4. Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, Ruiter DJ. Matrix metalloproteinases in human melanoma. *J Invest Dermatol.* 2000; 115(3):337-44.
5. Chen Y, Chen Y, Huang L, Yu J. Evaluation of heparanase and matrix metalloproteinase-9 in patients with cutaneous malignant melanoma. *J Dermatol.* 2012; 39(4):339-43.

6. Finn L, Markovic SN, and Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med.* 2012; 10, 23.
7. Tuerk C, Gold L. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 1990; 249(4968): 505-10.
8. Ellington AD, Szostak JW. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 1990; 346(6287): 818-22.
9. Robertson DL, Joyce GF. Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single-stranded DNA. *Nature.* 1990; 344(6265):467-8.
10. Nimjee SM, Rusconi CP and Sullenger BA. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu. Rev. Med.* 2005; 56:555-583.
11. Bunka, D.H; Stockley, PG. Aptamer Come of Age-at last. *Nat.Rev. Microbiol.* 2006; 4: 558-596.
12. Lee SJ, Kwon YS, Lee J-e, Choi EJ, Lee CH, Song JY et al. Detection of vr-2332 strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus type ii using an aptamer-based sandwich-type assay. *Anal Chem.* 2012; 85: 66-74.
13. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol Eng.* 2007; (4):381-403.
14. Shigdar S, Macdonald J, O'Connor M, Wang T, Xiang D, Al Shamaileh H et al. Aptamers as theranostic agents: modifications, serum stability and functionalisation. *Sensors(Basel).* 2013; 13(10):13624-37.
15. Pestourie C, Tavitian B, and Duconge F. Aptamers against extracellular targets for in vivo applications. *Biochimie* 2005; 87:921-930.

16. Wang J, and Li G. Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application. *Curr. Med. Chem* 2011; 18:4107-4116.
17. Tan W, Donovan MJ, and Jiang J. Aptamers from Cell-Based Selection for Bioanalytical Applications. *Chem Rev.* 2013; 113(4): 2842-62.
18. Xiang D, Shigdar S, Qiao G, Wang T, Kouzani AZ, Zhou SF et al. Nucleic acid aptamer-guided cancer therapeutics and diagnostics: the next generation of cancer medicine. *Theranostics.* 2015; 5(1): 23-42.
19. Lao YH, Phua KKL, and Leong KW. Aptamer nanomedicine for cancer therapeutics: barriers and potential for translation. *ACS Nano.* 2015; 9(3): 2235-54.
20. Sun H and Zu Y. Aptamers and their applications in nanomedicine. *Small.* 2015; 11(20):2352-64.
21. Dassie JP and Giangrande P.H. Current progress on aptamer-targeted oligonucleotide therapeutics. *Ther Deliv.* 2013; 4(12):1527-46.
22. Kruspe S, Mittelberger F, Szameit K, Szameit K, and Hahn U. Aptamers as drug delivery vehicles. *ChemMedChem* 2014; 9: 1998-2011.
23. Meyer M, Scheper T, and Walter JG. Aptamers: versatile probes for flow cytometry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013; 97:7097-7109.
24. Shum KT, Zhou J, and Rossi JJ. Nucleic Acid Aptamers as Potential Therapeutic and Diagnostic Agents for Lymphoma. *J Cancer Ther.* 2013; 4(4):872-890.
25. Ozalp VC, Kavruk M, Dilek O, and Bayrac AT. Aptamers: molecular tools for medical diagnosis. *Curr Top Med Chem.* 2015; 15(12):1125-37.

26. Zhu G, Ye M, Donovan MJ, Song E, Zhao Z, Tan W. Nucleic acid aptamers: an emerging frontier in cancer therapy. *Chem Commun (Camb)*. 2012; 48(85):10472-80.
27. Noaparast Z, Hosseinimehr SJ, Piramoon M, Abedi SM. Tumor targeting with a (99m)Tc-labeled AS1411 aptamer in prostate tumor cells. *J Drug Target*. 2015; 12:1-9.
28. Jacobson O, Yan X, Niu G, Ma Y, Szajek LP, Shen B, Kieseewetter DO et al. PET Imaging of Tenascin-C with a Radiolabeled Single-Stranded DNA Aptamer. *J Nucl Med*. 2015; 56(4):616-21.
29. Javier DJ, Nitin N, Levy M, Ellington A, and Richards-Kortum R. Aptamer-Targeted Gold Nanoparticles As Molecular-Specific Contrast Agents for Reflectance Imaging. *Bioconjug. Chem*. 2008; 9:1309–1312.
30. Zhang C, Ji X, Zhang Y, Zhou G, Ke X, Wang H et al. One-pot synthesized aptamer-functionalized CdTe:Zn²⁺ quantum dots for tumor-targeted fluorescence imaging in vitro and in vivo. *Anal Chem*. 2013; 85(12):5843-9.
31. Chen H, Zhao J, Zhang M, Yang H, Ma Y, Gu Y. MUC1 aptamer-based near-infrared fluorescence probes for tumor imaging. *Mol Imaging Biol*. 2015; 17(1):38-48.
32. Cibiel A, Quang NN, Gombert K, Thézé B, Garofalakis A, Ducongé F. From ugly duckling to swan: unexpected identification from cell-SELEX of an anti-Annexin A2 aptamer targeting tumors. *PLoS One*. 2014 ; 9(1):e87002.
33. Da Rocha Gomes S, Miguel J, Eimer S, Ries C, Dausse E et al. (99m)Tc-MAG3-aptamer for imaging human tumors associated with high level of matrix metalloprotease-9. *Bioconjug Chem*. 2012; 23(11):2192-200.

34. Yu MK, Kim D, Lee I-H, et So J-S, Jeong YY, Jon S al. Image-guided prostate cancer therapy using aptamer-functionalized thermally cross-linked superparamagnetic iron oxide nanoparticles. *Small*. 2011; 7:2241-9.
35. Shi H, Tang Z, Kim Y, Nie H, Huang YF, He X et al. In vivo fluorescence imaging of tumors using molecular aptamers generated by cell-selex. *Chem-Asian J*. 2010; 5:2209-13.
36. Tavitian B, Ducongé F, Boisgard R, Dollé F. In vivo imaging of oligonucleotidic aptamers. *Methods Mol Biol*. 2009; 535:241-59.
37. Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang Y-F, Lynott CK, Heil J et al. Tumor targeting by an aptamer. *J Nucl Med*. 2006; 47:668-78
38. Hwang DW, Ko HY, Kim SK, Kim SK, Kim D, Lee DS et al. Development of a quadruple imaging modality by using nanoparticles. *Chemistry* 2009; 15:9387–9393.
39. Smith AM, and Nie S. Next-generation quantum dots. *Nat. Biotechnol*. 2009; 27:732–733.
40. Winnard P, Chang F, Rusckowski M, et al. Preparation and use of NHS-MAG3 for technetium-99m labeling of DNA. *Nucl. Med. Biol*. 1997; 24:425-32.
41. Shi J, Kim YS, Chakraborty S, Jia B, Wang F, Liu S. 2-Mercaptoacetylglycylglycyl (MAG2) as a bifunctional chelator for ^{99m}Tc-labeling of cyclic RGD dimers: effect of technetium chelate on tumor uptake and pharmacokinetics. *Bioconjug Chem*. 2009 Aug 19; 20(8):1559-68.
42. Okarvi SM, Jammaz IA. Preparation and in vitro and in vivo evaluation of technetium-99m-labeled folate and methotrexate conjugates as tumor imaging agents. *Cancer Biother Radiopharm*. 2006 Feb; 21(1):49-60.

43. Parat A, Kryza D, Degoul F, Taleb J, Viallard C, Janier M et al. Radiolabeled dendritic probes as tools for high in vivo tumor targeting: application to melanoma. *J. Mater. Chem. B* 2015; 3:2560–2571.
44. Rolland O, Turrin CO, Caminade AM, and Majoral JP. Dendrimers and nanomedicine: multivalency in action. *New J. Chem.* 2009; 33:1809–1824.

Figures

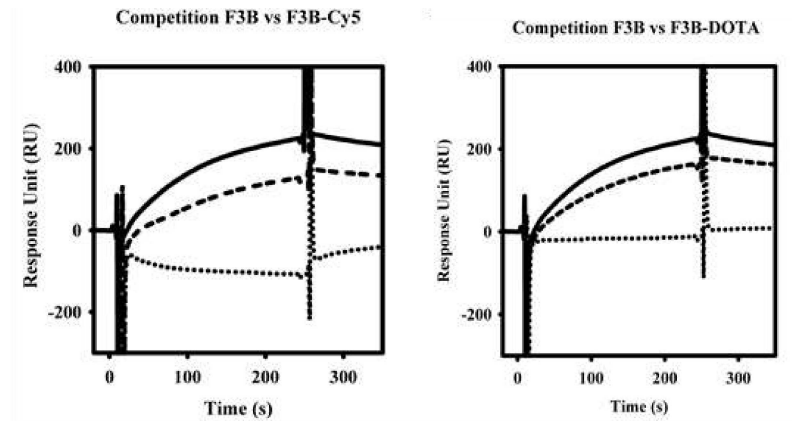


Figure 1.

F3B-biotine was immobilized on streptavidin chip. MMP9 (50 nM) was injected at $20 \mu\text{L} \cdot \text{mn}^{-1}$ alone (solid lines) or after pre-incubation with control conjugates (200 nM, dashed lines) or F3B conjugates (200 nM, dot lines). Pre-incubation with control conjugates (left panel: Cy5, right panel: DOTA) did not abolish complex formation. Whereas pre-incubation with F3B conjugates (left panel: Cy5, right panel: DOTA) led to complex abolition.

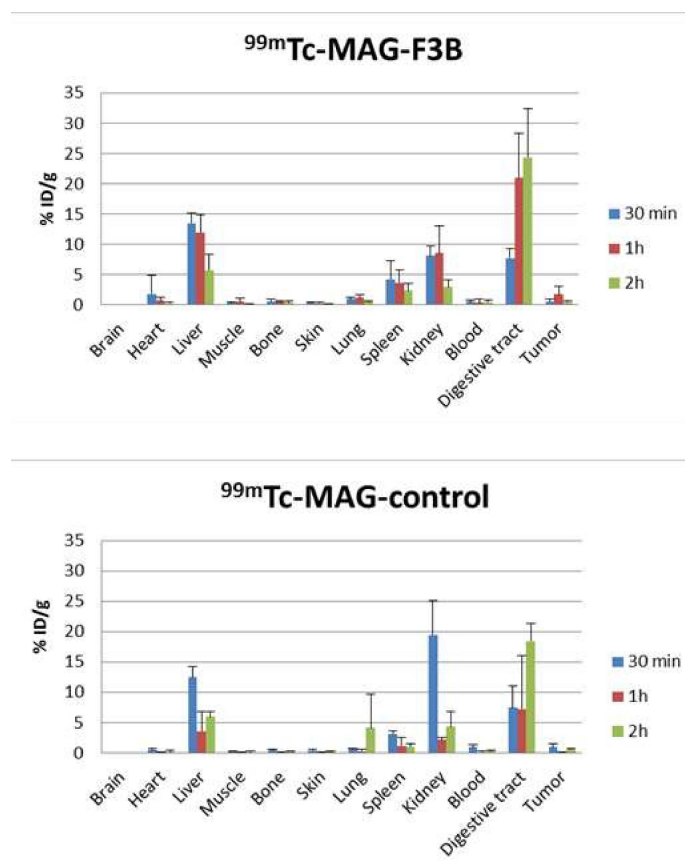


Figure 2. Quantitative biodistribution of ^{99m}Tc -MAG-aptamer and ^{99m}Tc -MAG-control aptamer as function of post i.v. injection delay (30 min, 1h and 2h) expressed as % of injected dose per gram of tissue.

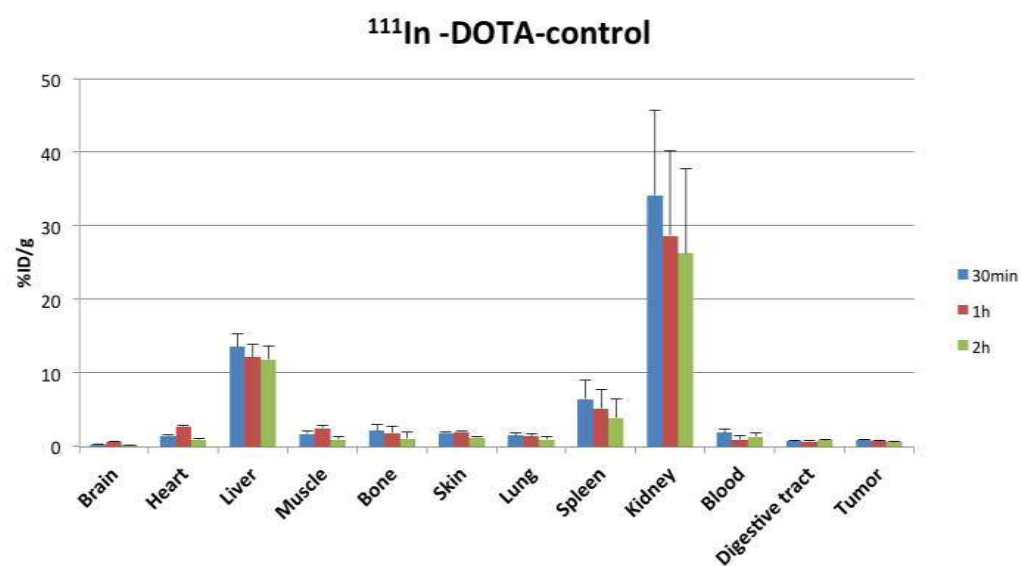
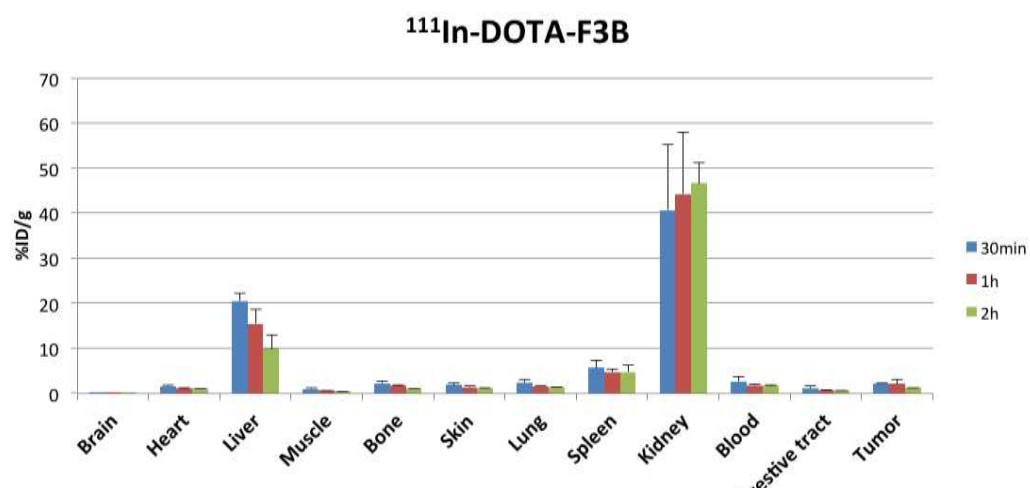


Figure 3. Quantitative biodistribution of ^{111}In -DOTA-F3B-aptamer and ^{111}In -DOTA-control-aptamer as function of post i.v. injection delay (30 min, 1h and 2h) expressed as % of injected dose per gram of tissue

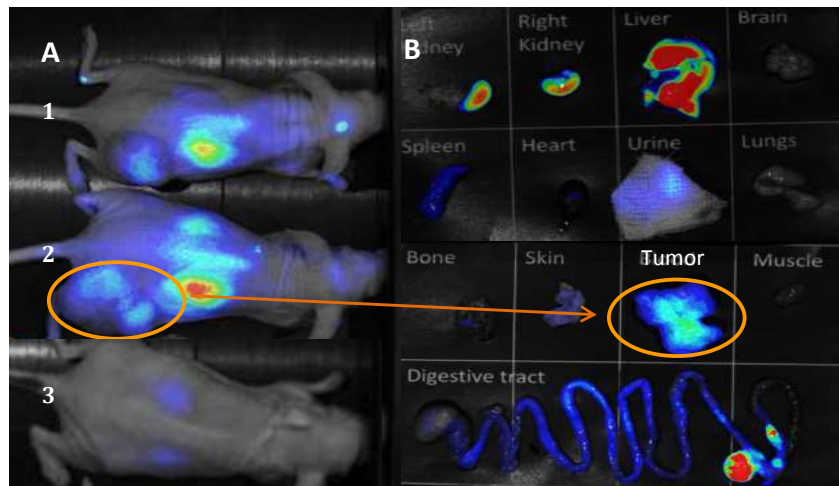


Figure 4. A: Ventral planar fluorescence reflectance images acquired at 1h post injection of Cy5-F3B-aptamer (1, 2) or Cy5-control-sequence (3) into mice bearing human melanoma tumors. B: Fluorescence reflectance imaging of organs after dissection of mice 2.

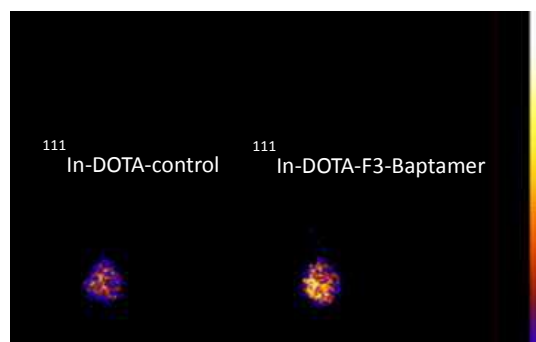


Figure 5. *Ex vivo* scintigraphic planar image of posterior paw at 1h after i. v. injection of ^{111}In -DOTA-F3B-aptamer and ^{111}In -DOTA-control-aptamer.

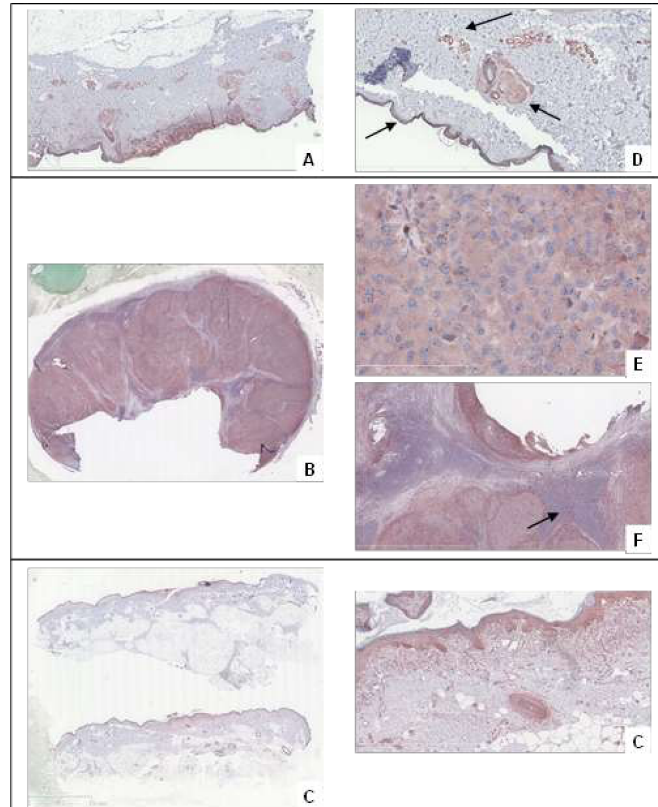


Figure 6. Immunostaining using anti-hMMP-9 murine monoclonal antibody. The antibody ab58803 localizing area of high expression of the integrin in respectively (A) Superficial Spread Melanoma, (B) Metastatic nodes, (C) Lentigo Malignant Melanoma.

(D) Background in the immunohistochemical analysis of Superficial Spread Melanoma with staining of epidermis, endothelial cells and sebaceous glands.

Immunohistochemical detection of hMMP-9 using ab58803 antibody in a mostly metastatic node, with specific cytoplasmic immunoreactivity in tumor cells (E) and negative results for conjunctive tissue and normal lymphocytes (F).

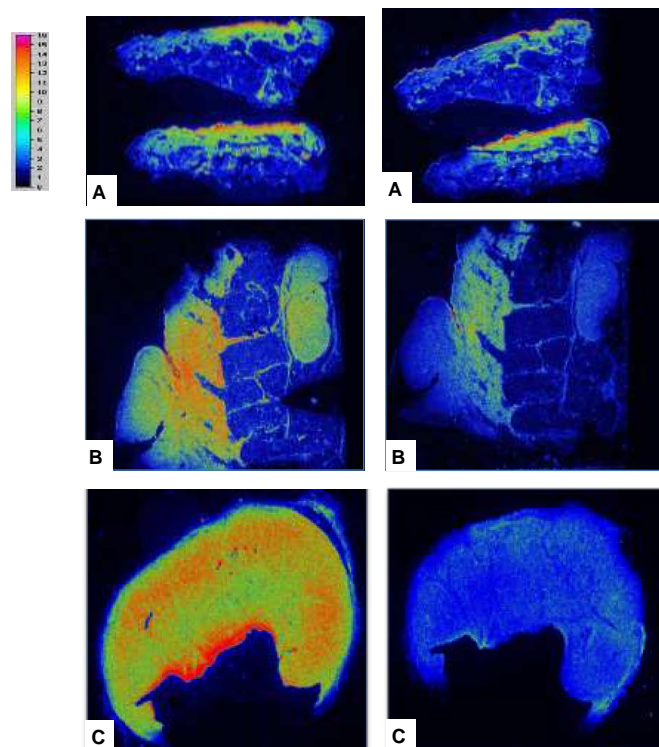


Figure 7. Comparison of the results obtained by radiolabeling of representative tumor tissue sections with ^{111}In -DOTA-F3B aptamer (left image) and ^{111}In -DOTA-control sequence (right image). The difference of activity seems to increase in a tumor grade-dependent manner.

(A) Lentigo malignant melanoma, (B) Nodular melanoma, (C) Mostly metastatic node.

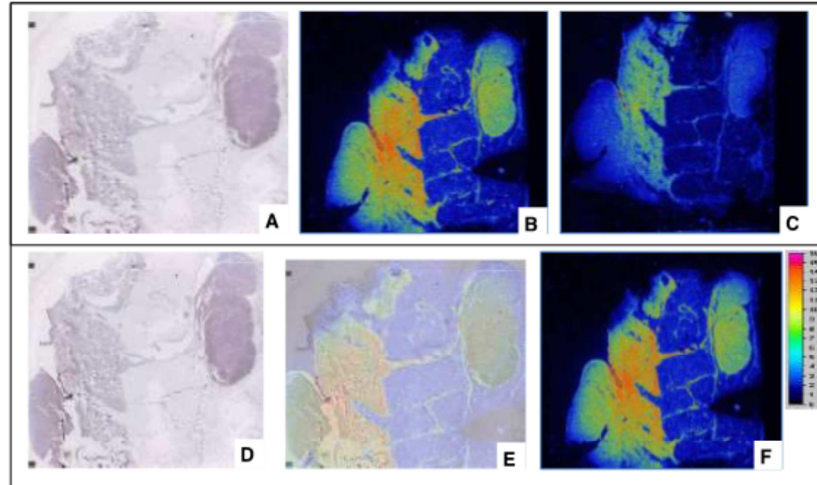
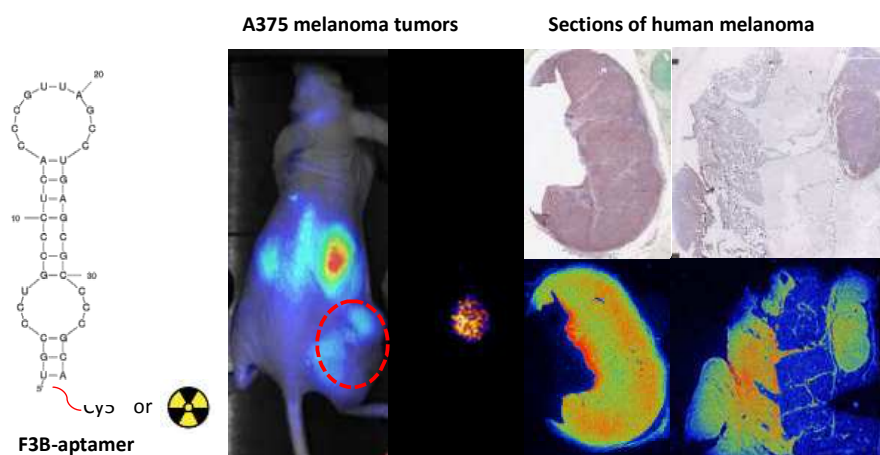


Figure 8. (A) Immunostaining of nodular melanoma using anti-hMMP-9 murine monoclonal antibody ab58803. Radiolabeling of adjacent tissue sections of nodular melanoma with ^{111}In -F3B-DOTA (B), and ^{111}In -DOTA-control sequence (C)

Comparison of the results obtained by radiolabeling with ^{111}In -DOTA-F3B and by immunostaining. The results of immunohistochemical images corresponded with area with high activity. (D) Immunostaining of nodular melanoma with ab58803 murin monoclonal antibody anti-human MMP-9. It's possible to identify the primitive nodular melanoma and an intrahypodermic node (E) Merged Images. (F) Radiolabeling with ^{111}In -DOTA-F3B.

Graphical Abstract



DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Les gliomes malins font partie des tumeurs primitives du cerveau les plus agressives, avec un taux de survie particulièrement faible, et un important risque de récurrence, et ce malgré l'agressivité des traitements utilisés [176,200].

Le diagnostic du mélanome repose essentiellement sur la clinique. Les techniques actuellement proposées pour la caractérisation et la stadification de cette pathologie manquent de spécificité, et présentent un taux relativement élevé de faux positifs et une faible sensibilité pour la détection de métastases et d'atteintes ganglionnaires. La prise en charge thérapeutique du mélanome requiert une détection précoce, par conséquent, il apparaît nécessaire de développer de nouveaux traceurs, qui pourront s'avérer capable de fournir une information diagnostique rapide et fiable [182,179,183,201,202].

L'objectif de ce travail est donc d'évaluer et de caractériser différents traceurs de la néoangiogenèse tumorale, le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), et le ^{18}F -ribofuranose-RGD, pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, et l' ^{111}In -DOTA-F3B pour la détection de la métalloprotéase matricielle 9. Ce projet s'inscrit dans une perspective de développement de radiopharmaceutiques et constitue une étape essentielle en vue de permettre une potentielle utilisation clinique des radiotraceurs. A cette fin, les peptides contenant la séquence RGD, sont utilisés pour l'imagerie moléculaire non invasive de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Ces traceurs constituent des outils intéressants susceptibles de répondre au besoin d'information précoce et de suivi de l'efficacité des traitements engagés. Le traceur technétié, au-delà de son intérêt évident en imagerie, s'est également révélé nécessaire pour la mise au point de l'ensemble des techniques d'analyse, pour des critères de radioprotectons et de disponibilité du radionucléide notamment. Le traceur fluoré, pour sa part, a rapidement été étudié chez l'animal, comme c'est souvent le cas avec ce type de traceurs. Le concept de bivalence a été appliqué au développement du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), un dimère RGD, afin d'accroître ses capacités de ciblage de l'intégrine en comparaison des dérivés monomériques. Le bis-anhydride de DTPA a été choisi comme chélateur pour ses deux sites réactifs potentiels. En effet, la conjugaison de peptide RGD est possible *via* la formation d'un pont amide entre l' ϵ -amine de la lysine et une fonction anhydride du chélate. Cette structure permet aussi la formation de complexe avec seulement un chélate par atome métallique, ce qui est nécessaire pour la stabilité *in vivo* et la préservation de l'activité biologique.

Concernant le ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), il s'est avéré nécessaire, dans un premier temps, d'optimiser la purification du traceur avec des techniques d'extraction en phase solide

à l'aide de cartouche Sep-Pak C18 Waters. Le remplacement de cette dernière par une cartouche Oasis HLB a permis d'augmenter considérablement le rendement de marquage, qui est désormais de l'ordre de 45 %. Celui-ci est encore à améliorer car reste faible pour un radiotraceur technétié. Diverses hypothèses ont été émises afin d'expliquer les valeurs obtenues. L'une d'entre elles porte sur un encombrement stérique des cycles RGD limitant le phénomène de chélation entre le technétium et le DTPA. Par conséquent, une des pistes envisagées est la mise en place de « linker » à base de triglycine ou de polyéthylène glycol afin d'augmenter la distance entre le DTPA et les cycles RGD et donc de limiter cette potentielle interaction. Les exemples de la littérature tels que la comparaison de ^{99m}Tc -HYNIC-RGD et ^{64}Cu -DOTA-RGD à différents substituants PEG ou triglycine (G_3) soulignent l'intérêt de ces espaceurs. Ils témoignent aussi d'une augmentation de l'affinité de liaison chez les cellules de gliomes U87MG due à la présence de 3PEG_4 et G_3 [114]. Par ailleurs, l'étude de ^{125}I -c(RGDyK) *versus* ^{125}I -RGD-PEG a montré une rétention tumorale accrue et une clairance sanguine accélérée de la part du dérivé pegylé [75].

La spécificité du ciblage du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) vis-à-vis de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été démontrée *in vitro* par l'inhibition de son interaction lors d'analyses cellulaires et sur récepteurs. Le test de binding a confirmé la valeur d' IC_{50} de l'échistatine avancée par la littérature, et témoigne de la forte affinité de notre traceur technétié pour l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Cette affinité a ensuite été confirmée par des essais cellulaires conduisant à une excellente valeur de K_d [75]. Les résultats obtenus sont d'ailleurs meilleurs que ceux du contrôle positif c(RGDfK). Ceci confirme l'intérêt de l'utilisation de dimère RGD pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. De plus, seuls les dérivés RGD sont entrés en compétition et ont déplacé l'interaction de l'échistatine avec les récepteurs $\alpha_v\beta_3$. Ce phénomène n'a pas été observé avec le peptide cyclique c(RADfK), ce qui confirme encore une fois l'implication de la séquence RGD dans la liaison à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et participe à la validation de nos techniques [203].

En ce qui concerne la détermination de l'affinité du peptide, différents paramètres doivent être pris en compte. Tout d'abord, le ciblage de la tumeur et les résultats des tests d'affinité dépendent de la quantité d'intégrine exprimée au niveau cellulaire et du réseau vasculaire de la tumeur, ainsi que des conditions utilisées pour l'expérience, comme la nature du milieu réactionnel. Des études présentent de meilleurs résultats sur cellules entières, que sur récepteurs purifiés. Il n'est donc pas possible d'exclure le fait que les peptides RGD puissent se lier de façon non spécifique aux autres intégrines. Ces tests permettent néanmoins

de conclure sur les excellences aptitudes de notre traceur, c'est à dire une forte affinité et spécificité potentielle pour le ciblage de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [2,75,176].

Pour faciliter l'interprétation des expérimentations *in vivo* et *in vitro*, l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ a été évaluée sur nos différentes lignées cellulaires et sur des coupes histologiques à notre disposition. Les résultats des radiomarquages cellulaires et sur coupes ont ensuite pu être comparés à ceux des techniques immunologiques servant de référence, afin de relier l'intensité du signal du radiotraceur au niveau d'expression de sa cible. En outre, l'utilisation de contrôles positifs et négatifs lors des tests cellulaires et tissulaires nous a permis de valider la spécificité de la liaison du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK). Aussi, lors de la validation de nos modèles cellulaires et de coupes de tissus humains quant à l'expression de l'intégrine, les cellules SKMEL28, B16F10 et U87MG ont confirmé l'expression de $\alpha_v\beta_3$. Les cellules C6 ont révélé l'absence de surexpression de cette intégrine. Les cellules SF188 ont, pour leur part, montré un marquage limité en immunocytochimie. Ces derniers résultats *a priori* contradictoires avec les données connues ont été confirmés par la faible fixation de radiotraceur observée sur ce type cellulaire. Une altération du phénotype cellulaire est peut être à l'origine de ces observations.

Quant aux différents types de mélanomes étudiés, les coupes de mélanomes SSM et de Dubreuilh se sont révélées positives en immunohistochimie et témoignent d'une surexpression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Les premières lames de mélanomes ALM et nodulaires se sont pour leur part révélées négatives. La seconde analyse immunohistochimique réalisée en parallèle de l'exploration de l'expression de la MMP-9 a permis de visualiser une surexpression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ sur tous les types de mélanomes. Ceci témoigne d'une certaine hétérogénéité de la présence de cette intégrine à la fois tumeur et patient dépendante. Ce constat renforce l'intérêt clinique de l'utilisation de radiotraceur de la néoangiogenèse tumorale pour la prise en charge diagnostique et thérapeutique de patients atteints de telles pathologies.

La co-localisation des marquages de l'anticorps monoclonale LM609 et du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), de même que les études de déplacement en présence d'un excès de ligand froid (c(RGDfK), 1 mM), confirment la spécificité de la fixation. Afin d'optimiser les conditions opératoires, et d'atteindre un état d'équilibre, un temps d'incubation de 90 minutes est requis pour le radiomarquage.

La valeur du Log P est en accord avec le temps de rétention obtenu en CLHP, et souligne les propriétés hydrophiles du traceur, mêmes si elles demeurent moins avantageuses que certaines références, comme le ^{99m}Tc -HYNIC-RGD (Log $P = -3,5$) [95].

L'imagerie TEMP témoigne de l'importance de la fixation du traceur sur les récepteurs $\alpha_v\beta_3$ des tumeurs surexprimant l'intégrine, en comparaison notamment avec l'absence de fixation sur les témoins négatifs xénogreffés. Ceci confirme encore une fois la spécificité de la fixation *in vivo* médiée par ce récepteur. Les tumeurs sont donc clairement identifiées en TEMP-TDM et ce avec un bon contraste. Si l'on considère les propriétés de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, il n'est pas surprenant de retrouver une fixation non négligeable dans les poumons de l'animal [117,204]. La forte spécificité et sélectivité en termes de fixation et de distribution ont été confirmés sur des modèles animaux avec et sans co-administration d'une dose de compétition (c(RGDfK)).

Du fait de la grande variété d'éléments de liaison ou « linkers » et de chélates disponibles pour les traceurs technétiés, il est difficile d'établir une véritable comparaison entre les peptides RGD radiomarqués. Toutefois, il est possible de noter que le ciblage tumoral du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK) est comparable à celui observé pour le c(RGDfK)-(Orn)3-[CGG- ^{99m}Tc] ($3,32 \pm 0,09$ % ID/g à 30 min p.i.), ou pour le ^{99m}Tc -AuNP-RGD ($3,65 \pm 0,19$ % ID/g à 60 min p.i.). Il s'avère supérieur aux caractéristiques du ^{99m}Tc -PGC-c(RGDyK) dont la fixation tumorale est de $1,38 \pm 0,30$ % ID/g à 120 min p.i. ou à celles du ^{99m}Tc -DKCK-RGD (1,1 % ID/g dans le mélanome, 2,2 % ID/g pour l'ostéosarcome, à 240 min p.i.) [205–208].

Les peptides monomériques peuvent se révéler intéressants pour l'imagerie de l'expression tumorale de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, mais une amélioration de leur pharmacocinétique s'avère nécessaire en vue d'une utilisation en clinique. En effet, ils présentent en générale une fixation tumorale limitée et une excrétion hépatobiliaire non favorable à l'imagerie. Donc pour améliorer à la fois les qualités de ciblage et la pharmacocinétique de ces traceurs, la multimérisation a été explorée ainsi que l'usage de différents types de linkers. L'incorporation de composé sucré aboutit par exemple à une plus grande hydrophilie et oriente vers une élimination rénale [112,209].

Les propriétés pharmacocinétiques favorables de notre traceur dimérique s'expliquent par sa taille réduite et son caractère hydrophile. La voie d'élimination est alors majoritairement rénale. L'utilisation de composé dimérique semble être un bon compromis

entre affinité, fixation tumorale et bruit de fond, et coût de la molécule. Les résultats obtenus par Chen *et al* avec des peptides RGD cycliques tétramériques E[E-[c(RGDyK)]₂]₂ et octamériques E[E[E-[c(RGDfK)]₂]₂]₂ marqués au ¹⁸F et ⁶⁴Cu, et de Liu *et al* avec le E[E-[c(RGDfK)]₂]₂ marqué au ^{99m}Tc et au ⁶⁴Cu confirment ce choix [210,211]. En effet, les composés multimériques se caractérisent par une accumulation tumorale accrue comparativement aux dimères, mais comme c'est le cas pour la plupart des tétramères, ils s'accumulent aussi de façon non négligeable dans le foie et les muscles, rendant le ratio de fixation tumeur/bruit de fond similaire à celui de dimères. Ceci souligne la nécessité de trouver un équilibre entre densité des épitopes et taille de la molécule traceuse.

La liaison aux protéines plasmatiques et la lipophilie varie considérablement entre les différents conjugués existants, ce qui conduit à des profils de biodistribution et des capacités de fixation tumorale profondément différents (0,2 - 2,7 % ID/g). Néanmoins, d'autres dérivés RGD, tels que le ^{99m}Tc-EDDA-HYNIC-RGD, le c(RGDfK)-(Orn)₃-[CGG-^{99m}Tc], le ^{99m}TcO(MAG₂-3G₃-dimer), ou le ^{99m}Tc-RAFT-RGD, présentent aussi une voie d'élimination majoritairement urinaire et dans une moindre mesure, une légère excrétion hépatobiliaire [95,205,212,213].

L'élimination rapide du traceur des organes sains semble liée à la densité en intégrines. L'imagerie précoce est facilitée par cette rapide réduction du bruit de fond au sein de l'organisme. Mais à des points d'évaluation plus tardifs, la qualité de l'image est encore améliorée par une diminution accrue du signal des tissus environnants [208].

Toujours dans cet objectif d'offrir un nouvel outil performant pour la détection précoce de tumeur, de suivi et d'optimisation de la thérapeutique, la TEP-TDM est une modalité d'imagerie particulièrement attractive. Différents traceurs ont été décrits, comme par exemple le ¹⁸F-galacto-RGD. Même si la biodistribution de ce traceur est prometteuse, sa radiosynthèse demeure un problème. Ainsi, il est nécessaire d'optimiser la stratégie de marquage en utilisant par exemple la formation d'oxime ou la « chimie click ».

Au sein de ce travail impliquant notre équipe de radiochimie, l'ISM et le CRCT, nous avons établi l'intérêt de l'imagerie TEP de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ à l'aide d'un nouveau traceur fluoré. Le ¹⁸F-ribofuranose-RGD a en effet permis d'étudier l'efficacité d'un nouveau traitement anti-angiogénique sur un modèle tumoral murin de mélanome xéno greffé chez la souris C57Black/6.

La technique de radiomarquage direct de ce traceur constitue une véritable amélioration par rapport au procédé de marquage utilisant des groupements prosthétiques. Ces derniers impliquent de multiples étapes, et nécessitent beaucoup de temps. Notre stratégie permet de façon facile, de produire ce traceur sur un automate disponible dans le commerce, selon les conditions requises pour les médicaments radiopharmaceutiques utilisés en clinique (en partant d'une activité de 100 GBq). Le ^{18}F -ribofuranose-RGD est obtenu avec un meilleur rendement de marquage et une meilleure activité spécifique que ses concurrents, même ceux qui, actuellement, font l'objet d'essais cliniques pour l'imagerie de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ [191].

La pharmacocinétique de notre monomère RGD doit par contre être améliorée. Une nouvelle génération de traceurs est en cours d'élaboration. Les deux principaux objectifs sont, d'une part le développement d'une structure dimérique en vue d'accroître l'affinité du traceur pour sa cible, et d'autre part, la modification de la composante sucrée pour augmenter la balance hydrophile/lipophile et donc permettre de limiter l'élimination hépatobiliaire au profit d'une excrétion rénale (structure Di-RGD-Si ^{18}F).

De ce fait, il est intéressant de noter que ce traceur offre une grande flexibilité d'évolution de sa structure, avec une possible modification indépendante de chaque bloc. De plus, le ribofuranose est plus facilement substituable que d'autres sucres comme le galactose, ce qui offre des perspectives d'évolution structurale en vue d'améliorer les propriétés pharmacocinétiques du radioligand. La structure existante favorise également l'introduction d'un second cycle RGD, toutefois afin de limiter le risque d'interaction stérique et permettre une synthèse facilitée et un ciblage optimal de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$, le remplacement du sucre par un espaceur PEG est aussi évalué.

D'autres pistes sont envisagées en vue de fournir une imagerie de la néoangiogenèse tumorale. Le ciblage de la MMP-9 en fait partie. Le choix a été fait d'utiliser des aptamères qui constituent une piste intéressante en imagerie diagnostique. Leur taille et leurs propriétés (petite taille, molécule non-immunogénique, affinité similaire à celle des anticorps, etc) font de ces oligonucléotides des traceurs de haute affinité et spécificité [214–216]. Du fait de la faible stabilité de ces petits oligonucléotides au sein des liquides biologiques, un aptamère modifié a été élaboré à l'aide de dérivés 2'O-méthyl. Ceci permet d'accroître la résistance à l'égard de l'action des Rnases/nucléases.

L' ^{111}In -DOTA-F3B est donc évalué en collaboration avec les équipes de l'ILM, l'ISM et de l'ARNA. Nos partenaires ont vérifié que l'aptamère restait capable après synthèse de se lier à la hMMP-9, ainsi qu'à sa pro-forme avec une forte avidité. Ils ont pu déterminer que ce traceur présente une forte affinité vis-à-vis de la MMP-9, avec un K_d de 10 nM. L'étude de biodistribution, réalisée par l'équipe lyonnaise, témoigne d'une faible rétention au sein des tissus sains, à l'exception des reins et du foie. La fixation tumorale évaluée chez l'animal est significativement plus importante pour le traceur que pour le contrôle (test t de Student, $p < 0,05$), avec un ratio de fixation tumeur/muscle de 4,0, 1 heure après injection *versus* 0,3 pour le ratio du contrôle. L'expérience du ^{99m}Tc -MAG-aptamère, nous a indiqué la nécessité d'améliorer le caractère hydrophile du traceur afin de limiter un bruit de fond digestif délétère pour l'imagerie [199]. Pour ce faire, les chimistes ont fait le choix d'introduire dans la structure un DOTA. Ce chélate présente de multiples avantages. D'une part, il permet de réaliser un radiomarquage dans des conditions douces avec de nombreux radionucléides dont l'indium 111, et avec une importante pureté radiochimique. De plus ses propriétés hydrophiles et anioniques orientent vers une biodistribution favorable, et conduisent à une diminution de l'élimination digestive en comparaison avec le ^{99m}Tc -MAG-aptamère ($< 2\%$ ID/g à chaque temps). Le traceur a été évalué sur coupes humaines de mélanomes. Différents types de mélanomes ont été explorés en radiomarquage en parallèle de tests immunohistochimiques évaluant la présence de la MMP-9. Les résultats ont alors confirmé la surexpression de la MMP-9 dans le cadre des mélanomes, et ont présenté une bonne correspondance entre la fixation de l' ^{111}In -DOTA-F3B et celle de l'anticorps. Les résultats du radiomarquage et de l'immunohistochimie permettent d'établir une relation entre l'expression de la MMP-9, la fixation du radiotraceur et le grade de la pathologie. En outre, la spécificité de la réaction est validée par un signal plus faible obtenu avec l'oligonucléotide contrôle. Nos échantillons ne sont néanmoins pas de taille statistiquement significative, il conviendrait donc dans de futurs travaux de les valider à plus grande échelle. Une étude immunohistochimique a été menée sur quelques coupes afin de comparer sur des lames adjacentes l'expression de la MMP-9 et celle de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$. Pour l'essentiel des lames testées une adéquation de l'expression de ces deux cibles est retrouvée.

La présence du DOTA au sein du composé offre enfin la possibilité de le conjuguer à de nombreux métaux, émetteurs de rayonnements diagnostiques (γ , β^+), comme le gallium 68 en TEP-TDM, ou thérapeutiques (β^- , α) comme le lutétium 177, l'yttrium 90 ou le bismuth 213 ce qui ouvre la porte à une application théranostique. En vue d'améliorer les propriétés du

traceur, qu'il s'agisse à la fois de la pharmacocinétique et du ciblage, des évolutions de la structure sont d'ores-et déjà envisagées au sein de l'équipe avec par exemple la synthèse d'une forme dimérique, et l'introduction d'un motif PEG [217].

Notre travail a donc conduit à la caractérisation de radioligands spécifiques de cibles moléculaires intervenant lors de la néoangiogenèse. La présence de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de la MMP-9 ne se cantonne pas au compartiment vasculaire. En effet, comme le soulignent les résultats d'immunohistochimie et de radiomarquage sur coupes, leurs expressions sont retrouvées à la fois dans l'environnement vasculaire mais aussi au niveau des cellules tumorales. Par conséquent, les radioligands étudiés permettent une imagerie non pas de la néoangiogenèse mais de la tumeur angiogénique dans son ensemble.

Malgré l'apport indéniable de cette imagerie de la genèse des néovaisseaux, d'autres mécanismes peuvent compléter voire affiner les observations. Certains de ces paramètres sont par exemple évalués à l'aide d'autres modalités d'imagerie comme, pour le gliome, l'IRM de perfusion. Cette technique effectuée à l'aide d'agents de contraste est susceptible de fournir des renseignements tant sur le volume de la tumeur, que sur le volume sanguin régional et la densité vasculaire. L'IRM de perfusion est par ailleurs utilisée pour son intérêt diagnostique et pronostique dans la classification de Sainte Anne. Pour ce qui est de l'imagerie TEP, certains traceurs peuvent apporter des informations complémentaires. Le ^{18}F -FDG évalue l'activité du métabolisme glucidique, et malgré certaines limites, présente un intérêt notamment dans le suivi de tumeurs de bas grades pour diagnostiquer les dégénérescences anaplasiques [218]. La ^{11}C -méthionine, la ^{18}F -DOPA (^{18}F -fluoro-L-dihydroxyphénylalanine) et la ^{18}F -FET (^{18}F -fluoroéthyltyrosine) témoignent de l'augmentation du transport d'acides aminés dans les cellules tumorales, liée à la surexpression des transporteurs mais aussi aux modifications de la vascularisation et de la prolifération tumorale. D'autres traceurs sont envisageables, c'est le cas du ^{18}F -MISO (^{18}F -Fluoromisonidazole) qui détecte spécifiquement l'hypoxie tumorale, et de la ^{18}F -FLT (^{18}F -fluorothymidine) indicateur de la prolifération corrélé au Ki-67. Enfin l'utilisation de fusion multimodale est susceptible d'accroître la sensibilité et la spécificité globale de ces techniques d'imagerie.

Le $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA-bis-c(RGDfK), le ^{18}F -ribofuranose-RGD et l' ^{111}In -DOTA-F3B ont ainsi tous présenté leur intérêt dans le ciblage respectivement de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de la MMP-9. Il convient de poursuivre l'exploration des données pharmacocinétiques et d'appréhender la dosimétrie liée à l'usage de chacun de ces radiotraceurs afin de permettre

l'élaboration d'essais cliniques et leur usage futur chez l'Homme. Ces traceurs nécessitent encore d'être améliorés et caractérisés mais constituent une piste intéressante pour l'imagerie de l'expression de marqueurs de la néoangiogenèse tumorale. Leurs transpositions en clinique présentent de multiples perspectives avec par exemple la recherche et l'exploration de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ préalable à l'administration d'un traitement à base d'antagonistes ciblant cette intégrine. Ceci aura ensuite pour but la sélection des patients potentiellement répondeurs notamment afin d'entrer dans les essais cliniques de nouvelles molécules anti-angiogéniques, mais aussi afin d'évaluer leur efficacité thérapeutique et de permettre l'ajustement de la posologie au contexte clinique et à la physiologie du patient. Enfin, le rôle central de la MMP-9 et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ offre la possibilité d'acquérir une information précoce sur les processus de néoangiogenèse tumorale et de développement métastatique.

CONCLUSION GENERALE

L'objectif est désormais de cibler le mécanisme même du processus oncogénique et les modalités de dissémination de la maladie. Ce ciblage s'avère être d'un grand intérêt pour la détection précoce, la stadification, l'évaluation de l'agressivité et la sélection de patients répondeurs aux nouvelles thérapies. Notre laboratoire s'est donc intéressé à l'étude de différents traceurs pour l'imagerie de l'expression de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et de l'enzyme MMP-9. La mise au point et la caractérisation de ces radioligands *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, a nécessité l'usage de modèles tumoraux pour lesquels la néoangiogenèse est cruciale au développement de la maladie. Le mélanome malin et le gliome malin ont donc été sélectionnés pour fournir les supports cellulaires et tissulaires nécessaires à notre projet.

Les traceurs ont présenté une forte affinité pour leurs cibles et une importante efficacité dans leurs détections. Ils requièrent encore de nouvelles investigations mais présentent déjà un grand intérêt pour l'imagerie moléculaire TEMP et TEP de la néoangiogenèse tumorale.

La néoangiogenèse joue un rôle essentiel dans la croissance des tumeurs et leur dissémination métastatique. Elle constitue un point important dans le contrôle de la progression de cancers. Une meilleure connaissance de ce processus offre désormais la possibilité d'une prise en charge thérapeutique des pathologies cancéreuses avec actuellement un véritable essor des traitements anti-angiogéniques, dirigés notamment contre les protéines d'adhésion ou les facteurs de croissance et leurs voies de signalisation cellulaire. Il est alors nécessaire de disposer de techniques d'imagerie adaptées.

Ainsi, notre étude a démontré l'intérêt du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK), du ^{18}F -ribofuranose-RGD, et de l' ^{111}In -DOTA-F3B pour l'imagerie de tumeurs angiogéniques.

BIBLIOGRAPHIE

1. Schnell O, Krebs B, Carlsen J, Miederer I, Goetz C, Goldbrunner RH, et al. Imaging of integrin $\alpha(v)\beta(3)$ expression in patients with malignant glioma by [18F] Galacto-RGD positron emission tomography. *Neuro-oncology*. 2009;11:861–70.
2. Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.* 1995;1:27–31.
3. Feige J-J. [Tumor angiogenesis: recent progress and remaining challenges]. *Bull Cancer*. 2010;97:1305–10.
4. Ellis LM, Liu W, Ahmad SA, Fan F, Jung YD, Shaheen RM, et al. Overview of angiogenesis: Biologic implications for antiangiogenic therapy. *Semin. Oncol.* 2001;28:94–104.
5. Haubner R, Beer AJ, Wang H, Chen X. Positron emission tomography tracers for imaging angiogenesis. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2010;37 Suppl 1:S86–103.
6. Augé F, Hornebeck W, Laronze J-Y. A novel strategy for designing specific gelatinase A inhibitors: potential use to control tumor progression. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2004;49:277–82.
7. Bachmeier BE, Iancu CM, Jochum M, Nerlich AG. Matrix metalloproteinases in cancer: comparison of known and novel aspects of their inhibition as a therapeutic approach. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2005;5:149–63.
8. Rao JS. Molecular mechanisms of glioma invasiveness: the role of proteases. *Nat. Rev. Cancer*. 2003;3:489–501.
9. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 2003;200:448–64.
10. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J.* 1995;9:926–33.
11. ÉVALUATION D'UN RADIOLIGAND DE L'INTÉGRINE V3 (RAFT-RGD) POUR L'IMAGERIE MOLÉCULAIRE DE L'ANGIOGÈNESE TUMORALE. - these_SANCEY.pdf [Internet]. [cited 2015 Aug 19]. Available from: https://tel.archives-ouvertes.fr/file/index/docid/398973/filename/these_SANCEY.pdf
12. Adams RH, Alitalo K. Molecular regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2007;8:464–78.
13. Carmeliet P, De Smet F, Loges S, Mazzone M. Branching morphogenesis and antiangiogenesis candidates: tip cells lead the way. *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;6:315–26.
14. Yancopoulos GD, Klagsbrun M, Folkman J. Vasculogenesis, angiogenesis, and growth factors: ephrins enter the fray at the border. *Cell*. 1998;93:661–4.
15. Folkman J, Merler E, Abernathy C, Williams G. Isolation of a tumor factor responsible for angiogenesis. *J. Exp. Med.* 1971;133:275–88.

16. Bergers G, Benjamin LE. Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat. Rev. Cancer.* 2003;3:401–10.
17. Terry SYA, Abiraj K, Frielink C, van Dijk LK, Bussink J, Oyen WJ, et al. Imaging integrin $\alpha v \beta 3$ on blood vessels with ^{111}In -RGD2 in head and neck tumor xenografts. *J. Nucl. Med.* 2014;55:281–6.
18. Jain RK. Tumor angiogenesis and accessibility: role of vascular endothelial growth factor. *Semin. Oncol.* 2002;29:3–9.
19. Folberg R, Hendrix MJ, Maniotis AJ. Vasculogenic mimicry and tumor angiogenesis. *Am. J. Pathol.* 2000;156:361–81.
20. Haubner R, Decristoforo C. Radiolabelled RGD peptides and peptidomimetics for tumour targeting. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2009;14:872–86.
21. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J. Clin. Oncol.* 2005;23:1011–27.
22. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature.* 1992;359:843–5.
23. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature.* 2005;438:967–74.
24. Beer AJ, Schwaiger M. Imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ expression. *Cancer Metastasis Rev.* 2008;27:631–44.
25. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673–87.
26. Eliceiri BP, Cheres DA. Role of αv integrins during angiogenesis. *Cancer J.* 2000;6 Suppl 3:S245–9.
27. Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol. Biol. Cell.* 1993;4:1317–26.
28. Montgomery AM, Reisfeld RA, Cheres DA. Integrin $\alpha v \beta 3$ rescues melanoma cells from apoptosis in three-dimensional dermal collagen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994;91:8856–60.
29. Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM. Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J. Clin. Oncol.* 2000;18:1135–49.
30. John A, Tuszynski G. The role of matrix metalloproteinases in tumor angiogenesis and tumor metastasis. *Pathol. Oncol. Res.* 2001;7:14–23.
31. Birkedal-Hansen H. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995;7:728–35.

32. Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J.* 1993;7:1434–41.
33. Basset P, Okada A, Chenard MP, Kannan R, Stoll I, Anglard P, et al. Matrix metalloproteinases as stromal effectors of human carcinoma progression: therapeutic implications. *Matrix Biol.* 1997;15:535–41.
34. Van den Steen PE, Proost P, Wuyts A, Van Damme J, Opdenakker G. Neutrophil gelatinase B potentiates interleukin-8 tenfold by aminoterminal processing, whereas it degrades CTAP-III, PF-4, and GRO- α and leaves RANTES and MCP-2 intact. *Blood.* 2000;96:2673–81.
35. Bergers G, Javaherian K, Lo KM, Folkman J, Hanahan D. Effects of angiogenesis inhibitors on multistage carcinogenesis in mice. *Science.* 1999;284:808–12.
36. Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB. Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell.* 1986;47:487–98.
37. Koop S, Khokha R, Schmidt EE, MacDonald IC, Morris VL, Chambers AF, et al. Overexpression of metalloproteinase inhibitor in B16F10 cells does not affect extravasation but reduces tumor growth. *Cancer Res.* 1994;54:4791–7.
38. DeClerck YA. Interactions between tumour cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur. J. Cancer.* 2000;36:1258–68.
39. Chimiothèques de complexes du technétium et du rhénium ciblant l'intégrine α V β 3 : développement de traceurs pour la détection précoce de la néoangiogenèse tumorale - [zotero://attachment/168/](https://zotero.org/attachment/168/) [Internet]. [cited 2015 Aug 23]. Available from: [zotero://attachment/168/](https://zotero.org/attachment/168/)
40. Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N. Engl. J. Med.* 1971;285:1182–6.
41. Folkman J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov.* 2007;6:273–86.
42. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, Cartwright T, Hainsworth J, Heim W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004;350:2335–42.
43. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2007;357:2666–76.
44. Reck M, von Pawel J, Zatloukal P, Ramlau R, Gorbounova V, Hirsh V, et al. Phase III trial of cisplatin plus gemcitabine with either placebo or bevacizumab as first-line therapy for nonsquamous non-small-cell lung cancer: AVAIL. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:1227–34.

45. Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylík C, et al. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007;370:2103–11.
46. Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, et al. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N. Engl. J. Med*. 2003;349:427–34.
47. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, et al. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J. Clin. Oncol*. 2009;27:4733–40.
48. Ivy SP, Wick JY, Kaufman BM. An overview of small-molecule inhibitors of VEGFR signaling. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6:569–79.
49. Millard M, Odde S, Neamati N. Integrin targeted therapeutics. *Theranostics*. 2011;1:154–88.
50. Mullamitha SA, Ton NC, Parker GJM, Jackson A, Julyan PJ, Roberts C, et al. Phase I evaluation of a fully human anti- α v integrin monoclonal antibody (CNTO 95) in patients with advanced solid tumors. *Clin. Cancer Res*. 2007;13:2128–35.
51. Sawada K, Ohyagi-Hara C, Kimura T, Morishige K-I. Integrin inhibitors as a therapeutic agent for ovarian cancer. *J Oncol*. 2012;2012:915140.
52. Wang Z, Chui W-K, Ho PC. Integrin targeted drug and gene delivery. *Expert Opin Drug Deliv*. 2010;7:159–71.
53. Hersey P, Sosman J, O'Day S, Richards J, Bedikian A, Gonzalez R, et al. A randomized phase 2 study of etaracizumab, a monoclonal antibody against integrin α (v) β (3), + or - dacarbazine in patients with stage IV metastatic melanoma. *Cancer*. 2010;116:1526–34.
54. Cianfrocca ME, Kimmel KA, Gallo J, Cardoso T, Brown MM, Hudes G, et al. Phase 1 trial of the antiangiogenic peptide ATN-161 (Ac-PHSCN-NH(2)), a β integrin antagonist, in patients with solid tumours. *Br. J. Cancer*. 2006;94:1621–6.
55. Eskens F a. LM, Dumez H, Hoekstra R, Perschl A, Brindley C, Böttcher S, et al. Phase I and pharmacokinetic study of continuous twice weekly intravenous administration of Cilengitide (EMD 121974), a novel inhibitor of the integrins α v β 3 and α v β 5 in patients with advanced solid tumours. *Eur. J. Cancer*. 2003;39:917–26.
56. Hidalgo M, Eckhardt SG. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J. Natl. Cancer Inst*. 2001;93:178–93.
57. Brown PD. Clinical studies with matrix metalloproteinase inhibitors. *APMIS*. 1999;107:174–80.
58. Rudek MA, Figg WD, Dyer V, Dahut W, Turner ML, Steinberg SM, et al. Phase I clinical trial of oral COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer. *J. Clin. Oncol*. 2001;19:584–92.

59. Fields GB. New strategies for targeting matrix metalloproteinases. *Matrix Biol.* 2015;44-46:239–46.
60. Dobrucki LW, Sinusas AJ. Cardiovascular molecular imaging. *Semin Nucl Med.* 2005;35:73–81.
61. Schäfers M, Riemann B, Kopka K, Breyholz H-J, Wagner S, Schäfers KP, et al. Scintigraphic imaging of matrix metalloproteinase activity in the arterial wall in vivo. *Circulation.* 2004;109:2554–9.
62. Cathcart J, Pulkoski-Gross A, Cao J. Targeting Matrix Metalloproteinases in Cancer: Bringing New Life to Old Ideas. *Genes Dis.* 2015;2:26–34.
63. Zucker S, Cao J, Chen WT. Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment. *Oncogene.* 2000;19:6642–50.
64. Folkman J. Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.* 2002;29:15–8.
65. de Boüard S, Guillaumo J-S. [Angiogenesis and anti-angiogenic strategies for glioblastoma]. *Bull Cancer.* 2005;92:360–72.
66. Document.PDF - AngiogenesisImagingMethodsforClinicalTrials [Internet]. [cited 2015 Aug 20]. Available from: <http://imaging.cancer.gov/programsandresources/reportsandpublications/AngiogenesisImagingMethodsforClinicalTrials>
67. Miller JC, Pien HH, Sahani D, Sorensen AG, Thrall JH. Imaging angiogenesis: applications and potential for drug development. *J. Natl. Cancer Inst.* 2005;97:172–87.
68. Brasch RC, Daldrup H, Shames D, Wendland M, Okuhata Y, Rosenau W. Macromolecular contrast media-enhanced MRI estimates of microvascular permeability correlate with histopathologic tumor grade. *Acad Radiol.* 1998;5 Suppl 1:S2–5.
69. Sipkins DA, Cheresch DA, Kazemi MR, Nevin LM, Bednarski MD, Li KC. Detection of tumor angiogenesis in vivo by alphaVbeta3-targeted magnetic resonance imaging. *Nat. Med.* 1998;4:623–6.
70. Winter PM, Caruthers SD, Kassner A, Harris TD, Chinen LK, Allen JS, et al. Molecular imaging of angiogenesis in nascent Vx-2 rabbit tumors using a novel alpha(nu)beta3-targeted nanoparticle and 1.5 tesla magnetic resonance imaging. *Cancer Res.* 2003;63:5838–43.
71. Schmieder AH, Winter PM, Caruthers SD, Harris TD, Williams TA, Allen JS, et al. Molecular MR imaging of melanoma angiogenesis with alphanubeta3-targeted paramagnetic nanoparticles. *Magn Reson Med.* 2005;53:621–7.
72. Zhang C, Jugold M, Woenne EC, Lammers T, Morgenstern B, Mueller MM, et al. Specific targeting of tumor angiogenesis by RGD-conjugated ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles using a clinical 1.5-T magnetic resonance scanner. *Cancer Res.* 2007;67:1555–62.

73. Lee H-Y, Li Z, Chen K, Hsu AR, Xu C, Xie J, et al. PET/MRI dual-modality tumor imaging using arginine-glycine-aspartic (RGD)-conjugated radiolabeled iron oxide nanoparticles. *J. Nucl. Med.* 2008;49:1371–9.
74. Montet X, Montet-Abou K, Reynolds F, Weissleder R, Josephson L. Nanoparticle imaging of integrins on tumor cells. *Neoplasia*. 2006;8:214–22.
75. Kumar CC, Nie H, Rogers CP, Malkowski M, Maxwell E, Catino JJ, et al. Biochemical characterization of the binding of echistatin to integrin $\alpha v \beta 3$ receptor. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997;283:843–53.
76. Chen X, Conti PS, Moats RA. In vivo near-infrared fluorescence imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ in brain tumor xenografts. *Cancer Res.* 2004;64:8009–14.
77. Cai H, Conti PS. RGD-based PET tracers for imaging receptor integrin $\alpha v \beta 3$ expression. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2013;56:264–79.
78. Jin Z-H, Josserand V, Foillard S, Boturyn D, Dumy P, Favrot M-C, et al. In vivo optical imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ in mice using multivalent or monovalent cRGD targeting vectors. *Mol. Cancer.* 2007;6:41.
79. Mansfield JR, Gossage KW, Hoyt CC, Levenson RM. Autofluorescence removal, multiplexing, and automated analysis methods for in-vivo fluorescence imaging. *J Biomed Opt.* 2005;10:41207.
80. Cai W, Chen K, Li Z-B, Gambhir SS, Chen X. Dual-function probe for PET and near-infrared fluorescence imaging of tumor vasculature. *J. Nucl. Med.* 2007;48:1862–70.
81. Zeng D, Lee NS, Liu Y, Zhou D, Dence CS, Wooley KL, et al. ^{64}Cu Core-labeled nanoparticles with high specific activity via metal-free click chemistry. *ACS Nano.* 2012;6:5209–19.
82. Xie H, Diagaradjane P, Deorukhkar AA, Goins B, Bao A, Phillips WT, et al. Integrin $\alpha v \beta 3$ -targeted gold nanoshells augment tumor vasculature-specific imaging and therapy. *Int J Nanomedicine.* 2011;6:259–69.
83. 2005 - n° 4-5.pdf [Internet]. [cited 2015 Aug 23]. Available from: http://www.cnhim.org/Dossier%20du%20CNHIM%20-%20PDF/dossiers_2005/2005%20-%20n%C2%B0%204-5.pdf
84. referentiel-radiopharmacie.pdf.
85. van Hagen PM, Breeman WA, Bernard HF, Schaar M, Mooij CM, Srinivasan A, et al. Evaluation of a radiolabelled cyclic DTPA-RGD analogue for tumour imaging and radionuclide therapy. *Int. J. Cancer.* 2000;90:186–98.
86. Blankenberg FG, Levashova Z, Sarkar SK, Pizzonia J, Backer MV, Backer JM. Noninvasive assessment of tumor VEGF receptors in response to treatment with pazopanib: a molecular imaging study. *Transl Oncol.* 2010;3:56–64.

87. Nagengast WB, de Korte MA, Oude Munnink TH, Timmer-Bosscha H, den Dunnen WF, Hollema H, et al. ⁸⁹Zr-bevacizumab PET of early antiangiogenic tumor response to treatment with HSP90 inhibitor NVP-AUY922. *J. Nucl. Med.* 2010;51:761–7.
88. Jayson GC, Zweit J, Jackson A, Mulatero C, Julyan P, Ranson M, et al. Molecular imaging and biological evaluation of HuMV833 anti-VEGF antibody: implications for trial design of antiangiogenic antibodies. *J. Natl. Cancer Inst.* 2002;94:1484–93.
89. Li S, Peck-Radosavljevic M, Kienast O, Preitfellner J, Havlik E, Schima W, et al. Iodine-123-vascular endothelial growth factor-165 (123I-VEGF165). Biodistribution, safety and radiation dosimetry in patients with pancreatic carcinoma. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2004;48:198–206.
90. Cai W, Chen K, Mohamedali KA, Cao Q, Gambhir SS, Rosenblum MG, et al. PET of vascular endothelial growth factor receptor expression. *J. Nucl. Med.* 2006;47:2048–56.
91. Wang H, Cai W, Chen K, Li Z-B, Kashefi A, He L, et al. A new PET tracer specific for vascular endothelial growth factor receptor 2. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2007;34:2001–10.
92. Kessler H, Diefenbach B, Finsinger D, Geyer A, Gurrath M, Goodman S, et al. Design of superactive and selective integrin receptor antagonists containing the RGD sequence. *Lett Pept Sci.* 1995;2:155–60.
93. Haubner R, Wester HJ, Reuning U, Senekowitsch-Schmidtke R, Diefenbach B, Kessler H, et al. Radiolabeled alpha(v)beta3 integrin antagonists: a new class of tracers for tumor targeting. *J. Nucl. Med.* 1999;40:1061–71.
94. Decristoforo C, Santos I, Pietzsch HJ, Kuenstler JU, Duatti A, Smith CJ, et al. Comparison of in vitro and in vivo properties of [^{99m}Tc]cRGD peptides labeled using different novel Tc-cores. *Q J Nucl Med Mol Imaging.* 2007;51:33–41.
95. Decristoforo C, Faintuch-Linkowski B, Rey A, von Guggenberg E, Rupprich M, Hernandez-Gonzales I, et al. [^{99m}Tc]HYNIC-RGD for imaging integrin alphavbeta3 expression. *Nucl. Med. Biol.* 2006;33:945–52.
96. Bach-Gansmo T, Bogsrud TV, Skretting A. Integrin scintimammography using a dedicated breast imaging, solid-state gamma-camera and (99m)Tc-labelled NC100692. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2008;28:235–9.
97. Hua J, Dobrucki LW, Sadeghi MM, Zhang J, Bourke BN, Cavaliere P, et al. Noninvasive imaging of angiogenesis with a ^{99m}Tc-labeled peptide targeted at alphavbeta3 integrin after murine hindlimb ischemia. *Circulation.* 2005;111:3255–60.
98. Bach-Gansmo T, Danielsson R, Saracco A, Wilczek B, Bogsrud TV, Fangberget A, et al. Integrin receptor imaging of breast cancer: a proof-of-concept study to evaluate ^{99m}Tc-NC100692. *J. Nucl. Med.* 2006;47:1434–9.

99. Axelsson R, Bach-Gansmo T, Castell-Conesa J, McParland BJ, Study Group. An open-label, multicenter, phase 2a study to assess the feasibility of imaging metastases in late-stage cancer patients with the alpha v beta 3-selective angiogenesis imaging agent 99mTc-NC100692. *Acta Radiol.* 2010;51:40–6.
100. Gaertner FC, Kessler H, Wester H-J, Schwaiger M, Beer AJ. Radiolabelled RGD peptides for imaging and therapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2012;39 Suppl 1:S126–38.
101. Haubner R, Maschauer S, Prante O. PET radiopharmaceuticals for imaging integrin expression: tracers in clinical studies and recent developments. *Biomed Res Int.* 2014;2014:871609.
102. Mittra ES, Goris ML, Iagaru AH, Kardan A, Burton L, Berganos R, et al. Pilot pharmacokinetic and dosimetric studies of (18)F-FPPRGD2: a PET radiopharmaceutical agent for imaging $\alpha(v)\beta(3)$ integrin levels. *Radiology.* 2011;260:182–91.
103. Cho HJ, Lee JD, Park JY, Yun M, Kang WJ, Walsh JC, et al. First in human evaluation of a newly developed integrin binding PET tracer, 18F-RGD-K5 in patients with breast cancer: Comparison with 18F-FDG uptake pattern and microvessel density. *J NUCL MED MEETING ABSTRACTS.* 2009;50:1910.
104. Battle MR, Goggi JL, Allen L, Barnett J, Morrison MS. Monitoring tumor response to antiangiogenic sunitinib therapy with 18F-fluciclatide, an 18F-labeled $\alpha V\beta 3$ -integrin and $\alpha V\beta 5$ -integrin imaging agent. *J. Nucl. Med.* 2011;52:424–30.
105. Kim JH, Lee JS, Kang KW, Lee H-Y, Han S-W, Kim T-Y, et al. Whole-body distribution and radiation dosimetry of (68)Ga-NOTA-RGD, a positron emission tomography agent for angiogenesis imaging. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2012;27:65–71.
106. Jacobson O, Zhu L, Niu G, Weiss ID, Szajek LP, Ma Y, et al. MicroPET imaging of integrin $\alpha v\beta 3$ expressing tumors using 89Zr-RGD peptides. *Mol Imaging Biol.* 2011;13:1224–33.
107. Janssen M, Oyen WJG, Massuger LFAG, Frielink C, Dijkgraaf I, Edwards DS, et al. Comparison of a monomeric and dimeric radiolabeled RGD-peptide for tumor targeting. *Cancer Biother. Radiopharm.* 2002;17:641–6.
108. Dijkgraaf I, Kruijtzer JAW, Frielink C, Corstens FHM, Oyen WJG, Liskamp RMJ, et al. Alpha v beta 3 integrin-targeting of intraperitoneally growing tumors with a radiolabeled RGD peptide. *Int. J. Cancer.* 2007;120:605–10.
109. Chen X, Park R, Tohme M, Shahinian AH, Bading JR, Conti PS. MicroPET and autoradiographic imaging of breast cancer alpha v-integrin expression using 18F- and 64Cu-labeled RGD peptide. *Bioconjug. Chem.* 2004;15:41–9.
110. Decristoforo C, Hernandez Gonzalez I, Carlsen J, Rupprich M, Huisman M, Virgolini I, et al. 68Ga- and 111In-labelled DOTA-RGD peptides for imaging of $\alpha v\beta 3$ integrin expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2008;35:1507–15.

111. Jeong JM, Hong MK, Chang YS, Lee Y-S, Kim YJ, Cheon GJ, et al. Preparation of a promising angiogenesis PET imaging agent: ^{68}Ga -labeled c(RGDyK)-isothiocyanatobenzyl-1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid and feasibility studies in mice. *J. Nucl. Med.* 2008;49:830–6.
112. Haubner RH, Wester HJ, Weber WA, Schwaiger M. Radiotracer-based strategies to image angiogenesis. *Q J Nucl Med.* 2003;47:189–99.
113. Haubner R, Wester HJ, Burkhart F, Senekowitsch-Schmidtke R, Weber W, Goodman SL, et al. Glycosylated RGD-containing peptides: tracer for tumor targeting and angiogenesis imaging with improved biokinetics. *J. Nucl. Med.* 2001;42:326–36.
114. Haubner R, Weber WA, Beer AJ, Vabuliene E, Reim D, Sarbia M, et al. Noninvasive visualization of the activated $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin in cancer patients by positron emission tomography and [^{18}F]Galacto-RGD. *PLoS Med.* 2005;2:e70.
115. Chen X, Park R, Hou Y, Khankaldyian V, Gonzales-Gomez I, Tohme M, et al. MicroPET imaging of brain tumor angiogenesis with ^{18}F -labeled PEGylated RGD peptide. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2004;31:1081–9.
116. Chen X, Park R, Shahinian AH, Bading JR, Conti PS. Pharmacokinetics and tumor retention of ^{125}I -labeled RGD peptide are improved by PEGylation. *Nucl. Med. Biol.* 2004;31:11–9.
117. Haubner R, Kuhnast B, Mang C, Weber WA, Kessler H, Wester H-J, et al. [^{18}F]Galacto-RGD: synthesis, radiolabeling, metabolic stability, and radiation dose estimates. *Bioconjug. Chem.* 2004;15:61–9.
118. Beer AJ, Haubner R, Goebel M, Luderschmidt S, Spilker ME, Wester H-J, et al. Biodistribution and pharmacokinetics of the $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ -selective tracer ^{18}F -galacto-RGD in cancer patients. *J. Nucl. Med.* 2005;46:1333–41.
119. Beer AJ, Haubner R, Wolf I, Goebel M, Luderschmidt S, Niemeyer M, et al. PET-based human dosimetry of ^{18}F -galacto-RGD, a new radiotracer for imaging $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ expression. *J. Nucl. Med.* 2006;47:763–9.
120. Beer AJ, Niemeyer M, Carlsen J, Sarbia M, Nährig J, Watzlowik P, et al. Patterns of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ expression in primary and metastatic human breast cancer as shown by ^{18}F -Galacto-RGD PET. *J. Nucl. Med.* 2008;49:255–9.
121. Beer AJ, Grosu A-L, Carlsen J, Kolk A, Sarbia M, Stangier I, et al. [^{18}F]galacto-RGD positron emission tomography for imaging of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ expression on the neovasculature in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin. Cancer Res.* 2007;13:6610–6.
122. Liu S, Liu Z, Chen K, Yan Y, Watzlowik P, Wester H-J, et al. ^{18}F -labeled galacto and PEGylated RGD dimers for PET imaging of $\alpha\text{v}\beta\text{3}$ integrin expression. *Mol Imaging Biol.* 2010;12:530–8.

123. Liu S, Edwards DS, Ziegler MC, Harris AR, Hemingway SJ, Barrett JA. 99mTc-labeling of a hydrazinonicotinamide-conjugated vitronectin receptor antagonist useful for imaging tumors. *Bioconjug. Chem.* 2001;12:624–9.
124. Wu Z, Li Z-B, Chen K, Cai W, He L, Chin FT, et al. microPET of tumor integrin $\alpha v \beta 3$ expression using 18F-labeled PEGylated tetrameric RGD peptide (18F-FPRGD4). *J. Nucl. Med.* 2007;48:1536–44.
125. Sivolapenko GB, Skarlos D, Pectasides D, Stathopoulou E, Milonakis A, Sirmalis G, et al. Imaging of metastatic melanoma utilising a technetium-99m labelled RGD-containing synthetic peptide. *Eur J Nucl Med.* 1998;25:1383–9.
126. Liu Z, Niu G, Shi J, Liu S, Wang F, Liu S, et al. (68)Ga-labeled cyclic RGD dimers with Gly3 and PEG4 linkers: promising agents for tumor integrin $\alpha v \beta 3$ PET imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2009;36:947–57.
127. Shi J, Wang L, Kim Y-S, Zhai S, Liu Z, Chen X, et al. Improving tumor uptake and excretion kinetics of 99mTc-labeled cyclic arginine-glycine-aspartic (RGD) dimers with triglycine linkers. *J. Med. Chem.* 2008;51:7980–90.
128. Chakraborty S, Shi J, Kim Y-S, Zhou Y, Jia B, Wang F, et al. Evaluation of 111In-labeled cyclic RGD peptides: tetrameric not tetravalent. *Bioconjug. Chem.* 2010;21:969–78.
129. Poethko T, Schottelius M, Thumshirn G, Hersel U, Herz M, Henriksen G, et al. Two-step methodology for high-yield routine radiohalogenation of peptides: (18)F-labeled RGD and octreotide analogs. *J. Nucl. Med.* 2004;45:892–902.
130. Thumshirn G, Hersel U, Goodman SL, Kessler H. Multimeric cyclic RGD peptides as potential tools for tumor targeting: solid-phase peptide synthesis and chemoselective oxime ligation. *Chemistry.* 2003;9:2717–25.
131. Schirmacher E, Wängler B, Cypryk M, Bradtmöller G, Schäfer M, Eisenhut M, et al. Synthesis of p-(di-tert-butyl[(18)F]fluorosilyl)benzaldehyde ([18F]SiFA-A) with high specific activity by isotopic exchange: a convenient labeling synthon for the (18)F-labeling of N-amino-oxy derivatized peptides. *Bioconjug. Chem.* 2007;18:2085–9.
132. Prante O, Einsiedel J, Haubner R, Gmeiner P, Wester H-J, Kuwert T, et al. 3,4,6-Tri-O-acetyl-2-deoxy-2-[18F]fluoroglucopyranosyl phenylthiosulfonate: a thiol-reactive agent for the chemoselective 18F-glycosylation of peptides. *Bioconjug. Chem.* 2007;18:254–62.
133. Cai W, Zhang X, Wu Y, Chen X. A thiol-reactive 18F-labeling agent, N-[2-(4-18F-fluorobenzamido)ethyl]maleimide, and synthesis of RGD peptide-based tracer for PET imaging of $\alpha v \beta 3$ integrin expression. *J. Nucl. Med.* 2006;47:1172–80.
134. Maschauer S, Prante O. Sweetening pharmaceutical radiochemistry by (18)f-fluoroglycosylation: a short review. *Biomed Res Int.* 2014;2014:214748.

135. Mirfeizi L, Walsh J, Kolb H, Campbell-Verduyn L, Dierckx RA, Feringa BL, et al. Synthesis of [^{18}F]RGD-K5 by catalyzed [3 + 2] cycloaddition for imaging integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ expression in vivo. *Nucl. Med. Biol.* 2013;40:710–6.
136. Maschauer S, Haubner R, Kuwert T, Prante O. (^{18}F)-glyco-RGD peptides for PET imaging of integrin expression: efficient radiosynthesis by click chemistry and modulation of biodistribution by glycosylation. *Mol. Pharm.* 2014;11:505–15.
137. Li Z, Cai H, Hassink M, Blackman ML, Brown RCD, Conti PS, et al. Tetrazine-trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of ^{18}F labeled probes. *Chem. Commun. (Camb.)*. 2010;46:8043–5.
138. Selvaraj R, Liu S, Hassink M, Huang C-W, Yap L-P, Park R, et al. Tetrazine-trans-cyclooctene ligation for the rapid construction of integrin $\alpha\text{v}\beta_3$ targeted PET tracer based on a cyclic RGD peptide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2011;21:5011–4.
139. Liu Z, Li Y, Lozada J, Wong MQ, Greene J, Lin K-S, et al. Kit-like ^{18}F -labeling of RGD- ^{19}F -aryltrifluoroborate in high yield and at extraordinarily high specific activity with preliminary in vivo tumor imaging. *Nucl. Med. Biol.* 2013;40:841–9.
140. McBride WJ, Sharkey RM, Karacay H, D'Souza CA, Rossi EA, Laverman P, et al. A novel method of ^{18}F radiolabeling for PET. *J. Nucl. Med.* 2009;50:991–8.
141. Lang L, Li W, Guo N, Ma Y, Zhu L, Kiesewetter DO, et al. Comparison study of [^{18}F]FAI-NOTA-PRGD2, [^{18}F]FPPRGD2, and [^{68}Ga]Ga-NOTA-PRGD2 for PET imaging of U87MG tumors in mice. *Bioconjug. Chem.* 2011;22:2415–22.
142. Liu S, Liu H, Jiang H, Xu Y, Zhang H, Cheng Z. One-step radiosynthesis of ^{18}F -AIF-NOTA-RGD₂ for tumor angiogenesis PET imaging. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2011;38:1732–41.
143. McBride WJ, D'Souza CA, Sharkey RM, Karacay H, Rossi EA, Chang C-H, et al. Improved ^{18}F labeling of peptides with a fluoride-aluminum-chelate complex. *Bioconjug. Chem.* 2010;21:1331–40.
144. Guo N, Lang L, Gao H, Niu G, Kiesewetter DO, Xie Q, et al. Quantitative analysis and parametric imaging of ^{18}F -labeled monomeric and dimeric RGD peptides using compartment model. *Mol Imaging Biol.* 2012;14:743–52.
145. Guo N, Lang L, Li W, Kiesewetter DO, Gao H, Niu G, et al. Quantitative analysis and comparison study of [^{18}F]AIF-NOTA-PRGD2, [^{18}F]FPPRGD2 and [^{68}Ga]Ga-NOTA-PRGD2 using a reference tissue model. *PLoS ONE.* 2012;7:e37506.
146. Knetsch PA, Petrik M, Griessinger CM, Rangger C, Fani M, Kesenheimer C, et al. [^{68}Ga]NODAGA-RGD for imaging $\alpha\text{v}\beta_3$ integrin expression. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2011;38:1303–12.

147. Dumont RA, Deininger F, Haubner R, Maecke HR, Weber WA, Fani M. Novel (64)Cu- and (68)Ga-labeled RGD conjugates show improved PET imaging of $\alpha(v)\beta(3)$ integrin expression and facile radiosynthesis. *J. Nucl. Med.* 2011;52:1276–84.
148. Cai H, Li Z, Huang C-W, Park R, Conti PS. (64)Cu labeled AmBaSar-RGD2 for micro-PET imaging of integrin $\alpha v \beta 3$ expression. *Curr Radiopharm.* 2011;4:68–74.
149. Bhattacharyya S, Dixit M. Metallic radionuclides in the development of diagnostic and therapeutic radiopharmaceuticals. *Dalton Trans.* 2011;40:6112–28.
150. Liu S, Li Z, Yap L-P, Huang C-W, Park R, Conti PS. Efficient preparation and biological evaluation of a novel multivalency bifunctional chelator for ⁶⁴Cu radiopharmaceuticals. *Chemistry.* 2011;17:10222–5.
151. Liu S, Li D, Huang C-W, Yap L-P, Park R, Shan H, et al. The efficient synthesis and biological evaluation of novel bi-functionalized sarcophagine for (64)cu radiopharmaceuticals. *Theranostics.* 2012;2:589–96.
152. Ma MT, Neels OC, Denoyer D, Roselt P, Karas JA, Scanlon DB, et al. Gallium-68 complex of a macrobicyclic cage amine chelator tethered to two integrin-targeting peptides for diagnostic tumor imaging. *Bioconjug. Chem.* 2011;22:2093–103.
153. Notni J, Pohle K, Wester H-J. Be spoilt for choice with radiolabelled RGD peptides: preclinical evaluation of ⁶⁸Ga-TRAP(RGD)₃. *Nucl. Med. Biol.* 2013;40:33–41.
154. Boros E, Ferreira CL, Yapp DTT, Gill RK, Price EW, Adam MJ, et al. RGD conjugates of the H2dedpa scaffold: synthesis, labeling and imaging with ⁶⁸Ga. *Nucl. Med. Biol.* 2012;39:785–94.
155. Simeček J, Notni J, Kapp TG, Kessler H, Wester H-J. Benefits of NOPO as chelator in gallium-68 peptides, exemplified by preclinical characterization of (68)Ga-NOPO-c(RGDfK). *Mol. Pharm.* 2014;11:1687–95.
156. Tarli L, Balza E, Viti F, Borsi L, Castellani P, Berndorff D, et al. A high-affinity human antibody that targets tumoral blood vessels. *Blood.* 1999;94:192–8.
157. Santimaria M, Moscatelli G, Viale GL, Giovannoni L, Neri G, Viti F, et al. Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer. *Clin. Cancer Res.* 2003;9:571–9.
158. Borsi L, Balza E, Bestagno M, Castellani P, Carnemolla B, Biro A, et al. Selective targeting of tumoral vasculature: comparison of different formats of an antibody (L19) to the ED-B domain of fibronectin. *Int. J. Cancer.* 2002;102:75–85.
159. Berndorff D, Borkowski S, Sieger S, Rother A, Friebe M, Viti F, et al. Radioimmunotherapy of solid tumors by targeting extra domain B fibronectin: identification of the best-suited radioimmunoconjugate. *Clin. Cancer Res.* 2005;11:7053s – 7063s.

160. Rossin R, Berndorff D, Friebe M, Dinkelborg LM, Welch MJ. Small-animal PET of tumor angiogenesis using a (76)Br-labeled human recombinant antibody fragment to the ED-B domain of fibronectin. *J. Nucl. Med.* 2007;48:1172–9.
161. Tijink BM, Perk LR, Budde M, Stigter-van Walsum M, Visser GWM, Kloet RW, et al. (124)I-L19-SIP for immuno-PET imaging of tumour vasculature and guidance of (131)I-L19-SIP radioimmunotherapy. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging.* 2009;36:1235–44.
162. Iwata H, Kobayashi S, Iwase H, Masaoka A, Fujimoto N, Okada Y. Production of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human breast carcinomas. *Jpn. J. Cancer Res.* 1996;87:602–11.
163. Bremer C, Bredow S, Mahmood U, Weissleder R, Tung CH. Optical imaging of matrix metalloproteinase-2 activity in tumors: feasibility study in a mouse model. *Radiology.* 2001;221:523–9.
164. McIntyre JO, Fingleton B, Wells KS, Piston DW, Lynch CC, Gautam S, et al. Development of a novel fluorogenic proteolytic beacon for in vivo detection and imaging of tumour-associated matrix metalloproteinase-7 activity. *Biochem. J.* 2004;377:617–28.
165. Kuhnast B, Bodenstein C, Haubner R, Wester HJ, Senekowitsch-Schmidtke R, Schwaiger M, et al. Targeting of gelatinase activity with a radiolabeled cyclic HWGF peptide. *Nucl. Med. Biol.* 2004;31:337–44.
166. Oltenfreiter R, Staelens L, Lejeune A, Dumont F, Frankenne F, Foidart J-M, et al. New radioiodinated carboxylic and hydroxamic matrix metalloproteinase inhibitor tracers as potential tumor imaging agents. *Nucl. Med. Biol.* 2004;31:459–68.
167. Oltenfreiter R, Staelens L, Hillaert U, Heremans A, Noël A, Frankenne F, et al. Synthesis, radiosynthesis, in vitro and preliminary in vivo evaluation of biphenyl carboxylic and hydroxamic matrix metalloproteinase (MMP) inhibitors as potential tumor imaging agents. *Appl Radiat Isot.* 2005;62:903–13.
168. Zheng Q-H, Fei X, Liu X, Wang J-Q, Bin Sun H, Mock BH, et al. Synthesis and preliminary biological evaluation of MMP inhibitor radiotracers [11C]methyl-halo-CGS 27023A analogs, new potential PET breast cancer imaging agents. *Nucl. Med. Biol.* 2002;29:761–70.
169. Zheng QH, Fei X, Liu X, Wang JQ, Stone KL, Martinez TD, et al. Comparative studies of potential cancer biomarkers carbon-11 labeled MMP inhibitors (S)-2-(4'-[11C]methoxybiphenyl-4-sulfonylamino)-3-methylbutyric acid and N-hydroxy-(R)-2-[(4'-[11C]methoxyphenyl)sulfonyl]benzylamino]-3-methylbutanamide. *Nucl. Med. Biol.* 2004;31:77–85.
170. Matusiak N, van Waarde A, Bischoff R, Oltenfreiter R, van de Wiele C, Dierckx RAJO, et al. Probes for non-invasive matrix metalloproteinase-targeted imaging with PET and SPECT. *Curr. Pharm. Des.* 2013;19:4647–72.

171. Kulasegaram R, Giersing B, Page C, Blower P, Williamson R, Peters B, et al. In vivo evaluation of (111)In-DTPA-N-TIMP-2 in Kaposi sarcoma associated with HIV infection. *Eur J Nucl Med*. 2001;28:756–61.
172. Schäfers M, Schober O, Hermann S. Matrix-metalloproteinases as imaging targets for inflammatory activity in atherosclerotic plaques. *J. Nucl. Med*. 2010;51:663–6.
173. Desandes E, Clavel J, Berger C, Bernard J-L, Blouin P, de Lumley L, et al. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. *Pediatr Blood Cancer*. 2004;43:749–57.
174. Hargrave D. Paediatric high and low grade glioma: the impact of tumour biology on current and future therapy. *Br J Neurosurg*. 2009;23:351–63.
175. Chastagner P, Kalifa C, Doz F, Bouffet E, Gentet JC, Ruchoux MM, et al. Outcome of children treated with preradiation chemotherapy for a high-grade glioma: results of a French Society of Pediatric Oncology (SFOP) Pilot Study. *Pediatr Blood Cancer*. 2007;49:803–7.
176. Jain RK, di Tomaso E, Duda DG, Loeffler JS, Sorensen AG, Batchelor TT. Angiogenesis in brain tumours. *Nat. Rev. Neurosci*. 2007;8:610–22.
177. Norden AD, Drappatz J, Wen PY. Novel anti-angiogenic therapies for malignant gliomas. *Lancet Neurol*. 2008;7:1152–60.
178. Wong ET, Gautam S, Malchow C, Lun M, Pan E, Brem S. Bevacizumab for recurrent glioblastoma multiforme: a meta-analysis. *J Natl Compr Canc Netw*. 2011;9:403–7.
179. Balch CM, Gershenwald JE, Soong S-J, Thompson JF, Atkins MB, Byrd DR, et al. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J. Clin. Oncol*. 2009;27:6199–206.
180. Finn L, Markovic SN, Joseph RW. Therapy for metastatic melanoma: the past, present, and future. *BMC Med*. 2012;10:23.
181. Négrier S, Fervers B, Bailly C, Beckendorf V, Cupissol D, Doré JF, et al. [Standards, Options and Recommendations (SOR): clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up of cutaneous melanoma. Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer]. *Bull Cancer*. 2000;87:173–82.
182. Négrier S, Saiag P, Guillot B, Verola O, Avril M-F, Bailly C, et al. [Clinical practice guideline: 2005 update of recommendations for the management of patients with cutaneous melanoma without distant metastases (summary report)]. *Bull Cancer*. 2006;93:371–84.
183. Queirolo P, Acquati M. Targeted therapies in melanoma. *Cancer Treat. Rev*. 2006;32:524–31.
184. Leccia M-T, Planchamp F, Sassolas B, Combemale P, Modiano P, Bedane C, et al. Prise en charge thérapeutique des patients atteints d'un mélanome cutané métastatique : recommandations nationales françaises. *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*. 2014;141:111–21.

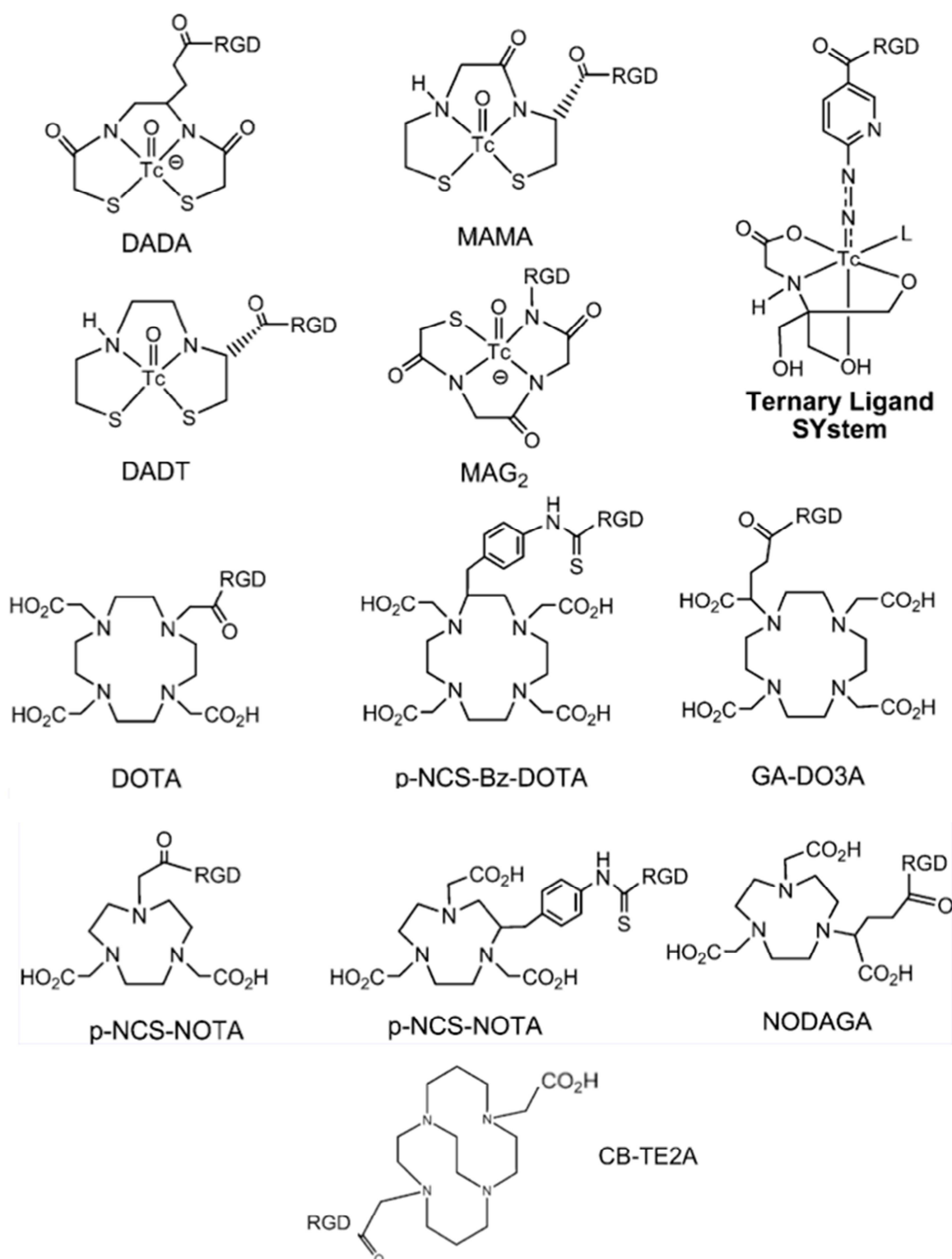
185. Fields GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. *Int. J. Pept. Protein Res.* 1990;35:161–214.
186. Hazari PP, Shukla G, Goel V, Chuttani K, Kumar N, Sharma R, et al. Synthesis of specific SPECT-radiopharmaceutical for tumor imaging based on methionine: ^{99m}Tc-DTPA-bis(methionine). *Bioconjug. Chem.* 2010;21:229–39.
187. Sethi SK, Varshney R, Rangaswamy S, Chadha N, Hazari PP, Kaul A, et al. Design, synthesis and preliminary evaluation of a novel SPECT DTPA-bis-triazaspirodecanone conjugate for D₂ receptor imaging. *RSC Adv.* 2014;4:50153–62.
188. Orlando RA, Cheresch DA. Arginine-glycine-aspartic acid binding leading to molecular stabilization between integrin alpha v beta 3 and its ligand. *J. Biol. Chem.* 1991;266:19543–50.
189. Höhne A, Mu L, Honer M, Schubiger PA, Ametamey SM, Graham K, et al. Synthesis, ¹⁸F-labeling, and in vitro and in vivo studies of bombesin peptides modified with silicon-based building blocks. *Bioconjug. Chem.* 2008;19:1871–9.
190. Schulz J, Vimont D, Bordenave T, James D, Escudier J-M, Allard M, et al. Silicon-Based Chemistry: An Original and Efficient One-Step Approach to [¹⁸F]-Nucleosides and [¹⁸F]-Oligonucleotides for PET Imaging. *Chemistry - A European Journal.* 2011;17:3096–100.
191. Amigues E, Schulz J, Szlosek-Pinaud M, Fernandez P, Silvente-Poirot S, Brillouet S, et al. [¹⁸F]Si-RiboRGD: From Design and Synthesis to the Imaging of αvβ3 Integrins in Melanoma Tumors. *ChemPlusChem.* 2012;77:345–9.
192. Nimjee SM, Rusconi CP, Sullenger BA. Aptamers: an emerging class of therapeutics. *Annu. Rev. Med.* 2005;56:555–83.
193. Bunka DHJ, Stockley PG. Aptamers come of age - at last. *Nat. Rev. Microbiol.* 2006;4:588–96.
194. Stoltenburg R, Reinemann C, Strehlitz B. SELEX--a (r)evolutionary method to generate high-affinity nucleic acid ligands. *Biomol. Eng.* 2007;24:381–403.
195. Shigdar S, Macdonald J, O'Connor M, Wang T, Xiang D, Al-Shamaileh H, et al. Aptamers as Theranostic Agents: Modifications, Serum Stability and Functionalisation. *Sensors.* 2013;13:13624–37.
196. Toulmé J-J, Da Rocha S, Dausse E, Azéma L, Lebars I, Moreau S. Les aptamères : du concept à l'outil. *Médecine Nucléaire.* 2007;31:478–84.
197. Wang J, Li G. Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application. *Curr. Med. Chem.* 2011;18:4107–16.
198. Tan W, Donovan MJ, Jiang J. Aptamers from cell-based selection for bioanalytical applications. *Chem. Rev.* 2013;113:2842–62.

199. Da Rocha Gomes S, Miguel J, Azéma L, Eimer S, Ries C, Dausse E, et al. (99m)Tc-MAG3-aptamer for imaging human tumors associated with high level of matrix metalloprotease-9. *Bioconjug. Chem.* 2012;23:2192–200.
200. Wen PY, Kesari S. Malignant gliomas in adults. *N. Engl. J. Med.* 2008;359:492–507.
201. Garbe C, Peris K, Hauschild A, Saiag P, Middleton M, Spatz A, et al. Diagnosis and treatment of melanoma. European consensus-based interdisciplinary guideline--Update 2012. *Eur. J. Cancer.* 2012;48:2375–90.
202. Bichakjian CK, Halpern AC, Johnson TM, Foote Hood A, Grichnik JM, Swetter SM, et al. Guidelines of care for the management of primary cutaneous melanoma. American Academy of Dermatology. *J. Am. Acad. Dermatol.* 2011;65:1032–47.
203. Fisher JE, Caulfield MP, Sato M, Quartuccio HA, Gould RJ, Garsky VM, et al. Inhibition of osteoclastic bone resorption in vivo by echistatin, an “arginyl-glycyl-aspartyl” (RGD)-containing protein. *Endocrinology.* 1993;132:1411–3.
204. Singh B, Fu C, Bhattacharya J. Vascular expression of the alpha(v)beta(3)-integrin in lung and other organs. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2000;278:L217–26.
205. Tsiapa I, Loudos G, Varvarigou A, Fragogeorgi E, Psimadas D, Tsotakos T, et al. Biological evaluation of an ornithine-modified (99m)Tc-labeled RGD peptide as an angiogenesis imaging agent. *Nucl. Med. Biol.* 2013;40:262–72.
206. Morales-Avila E, Ferro-Flores G, Ocampo-García BE, De León-Rodríguez LM, Santos-Cuevas CL, García-Becerra R, et al. Multimeric system of 99mTc-labeled gold nanoparticles conjugated to c[RGDfK(C)] for molecular imaging of tumor $\alpha(v)\beta(3)$ expression. *Bioconjug. Chem.* 2011;22:913–22.
207. Lee D-E, Hong Y-D, Choi K-H, Lee S-Y, Park P-H, Choi S-J. Preparation and evaluation of 99mTc-labeled cyclic arginine-glycine-aspartate (RGD) peptide for integrin targeting. *Appl Radiat Isot.* 2010;68:1896–902.
208. Haubner R, Bruchertseifer F, Bock M, Kessler H, Schwaiger M, Wester H-J. Synthesis and biological evaluation of a (99m)Tc-labelled cyclic RGD peptide for imaging the $\alpha v \beta 3$ expression. *Nuklearmedizin.* 2004;43:26–32.
209. Liu S. Radiolabeled cyclic RGD peptides as integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -targeted radiotracers: maximizing binding affinity via bivalency. *Bioconjug. Chem.* 2009;20:2199–213.
210. Wu Y, Zhang X, Xiong Z, Cheng Z, Fisher DR, Liu S, et al. microPET imaging of glioma integrin $\{\alpha\}v\{\beta\}3$ expression using (64)Cu-labeled tetrameric RGD peptide. *J. Nucl. Med.* 2005;46:1707–18.
211. Li Z-B, Cai W, Cao Q, Chen K, Wu Z, He L, et al. (64)Cu-labeled tetrameric and octameric RGD peptides for small-animal PET of tumor $\alpha(v)\beta(3)$ integrin expression. *J. Nucl. Med.* 2007;48:1162–71.

212. Shi J, Wang L, Kim Y-S, Zhai S, Jia B, Wang F, et al. $^{99m}\text{TcO}(\text{MAG2-3G3-dimer})$: a new integrin $\alpha(v)\beta(3)$ -targeted SPECT radiotracer with high tumor uptake and favorable pharmacokinetics. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2009;36:1874–84.
213. Sancey L, Ardisson V, Riou LM, Ahmadi M, Marti-Batlle D, Boturyn D, et al. In vivo imaging of tumour angiogenesis in mice with the $\alpha(v)\beta(3)$ integrin-targeted tracer ^{99m}Tc -RAFT-RGD. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2007;34:2037–47.
214. Noaparast Z, Hosseinimehr SJ, Piramoon M, Abedi SM. Tumor targeting with a $(^{99m})\text{Tc}$ -labeled AS1411 aptamer in prostate tumor cells. *J Drug Target*. 2015;23:497–505.
215. Jacobson O, Yan X, Niu G, Weiss ID, Ma Y, Szajek LP, et al. PET imaging of tenascin-C with a radiolabeled single-stranded DNA aptamer. *J. Nucl. Med*. 2015;56:616–21.
216. Hicke BJ, Stephens AW, Gould T, Chang Y-F, Lynott CK, Heil J, et al. Tumor targeting by an aptamer. *J. Nucl. Med*. 2006;47:668–78.
217. Rolland O, Turrin C-O, Caminade A-M, Majoral J-P. Dendrimers and nanomedicine: multivalency in action. *New Journal of Chemistry*. 2009;33:1809.
218. Spence AM, Muzi M, Mankoff DA, O'Sullivan SF, Link JM, Lewellen TK, et al. ^{18}F -FDG PET of gliomas at delayed intervals: improved distinction between tumor and normal gray matter. *J. Nucl. Med*. 2004;45:1653–9.

ANNEXES

Annexe 1 : Schémas des différents chélateurs habituellement utilisés pour le radiomarquage de peptides RGD cycliques au ^{99m}Tc , ^{68}Ga , et ^{64}Cu . DADA (diamidodithiol), MAMA (mono-amine-mono-amidedithiol), MADT (diaminedithiol), MAG2 (2-mecaptoacetylglycylglycyl), et HYNIC sont utilisés pour le technétium. DOTA, NOTA, CB-TE2A et leurs dérivés interviennent pour la chélation du gallium et du cuivre.

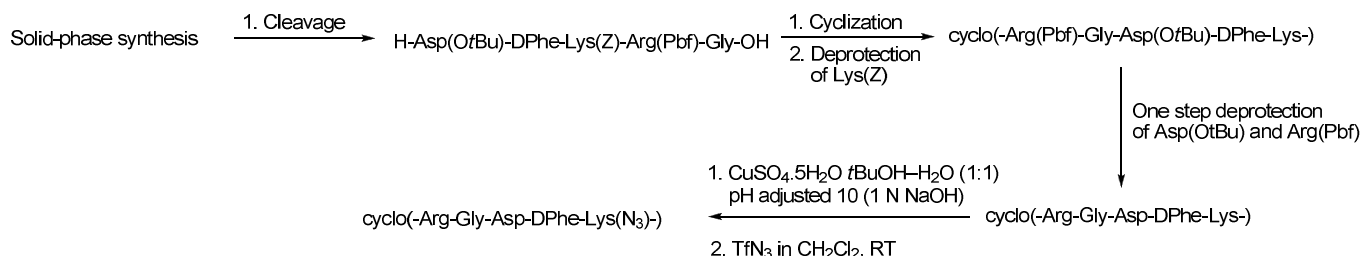


Annexe 2 : Tableau indiquant l'ensemble des paramètres ajustés afin d'accroître la pureté radiochimique et le rendement de marquage du ^{99m}Tc -DTPA-bis-c(RGDfK).

Entrée	Activité initiale	Précurseur	Réducteur	Base	Température	Temps	Purification	Activité produit final	η
1	74 MBq/300 μL	3.1 mg/500 μL	300 μL SnCl_2 1mg/mL AcOH 10%	1.1 mL Na_2CO_3 0.1M	65 °C	30 min	C18	12 MBq	16 %
2	144 MBq/500 μL	3.1 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 1mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	30 min	C18	19 MBq	13 %
3	180 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 1mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	30 MBq	17 %
4	137 MBq/500 μL	0.75 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 1mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	10 MBq	7 %
5	167 MBq/500 μL	0.75 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 0.1mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	20 MBq	12 %
6	163 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 0.5mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	29 MBq	18 %
7	180 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 dry 0.5mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	34 MBq	19 %
8	146 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 dry 0.5mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	39 MBq	27 %
9	157 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 dry 0.5mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	40 MBq	25 %
10	320 MBq/1mL	1.55 mg/600 μL	200 μL SnCl_2 0.5mg/mL AcOH 10%	1.5 mL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	40 MBq	13 %
11	167 MBq/500 mL	1.55 mg/300 mL	100 μL SnCl_2 0.5mg/mL AcOH 10% Ajout de tricine	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	6 MBq	4 %
12	143 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 0.5mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	26 MBq	18 %
13	153 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 0.5mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	32 MBq	21 %
14	156 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 0.5mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	30 MBq	19 %
15	174 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 0.5mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	C18	42 MBq	24 %
16	158 MBq/500 μL	1.55 mg/300 μL	100 μL SnCl_2 0.5mg/mL AcOH 10%	900 μL Na_2CO_3 0.1M	95 °C	45 min	OASIS HLB	71 MBq	45 %

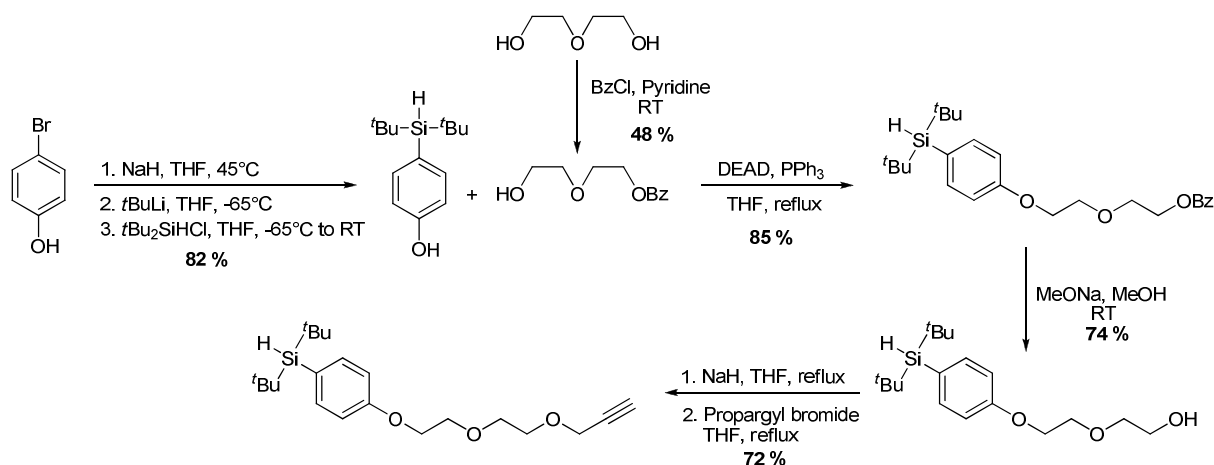
Annexe 3 : Schéma de synthèse du précurseur ribofuranose-c(RGDfK)

- Préparation du motif c(RGDfK(N₃))

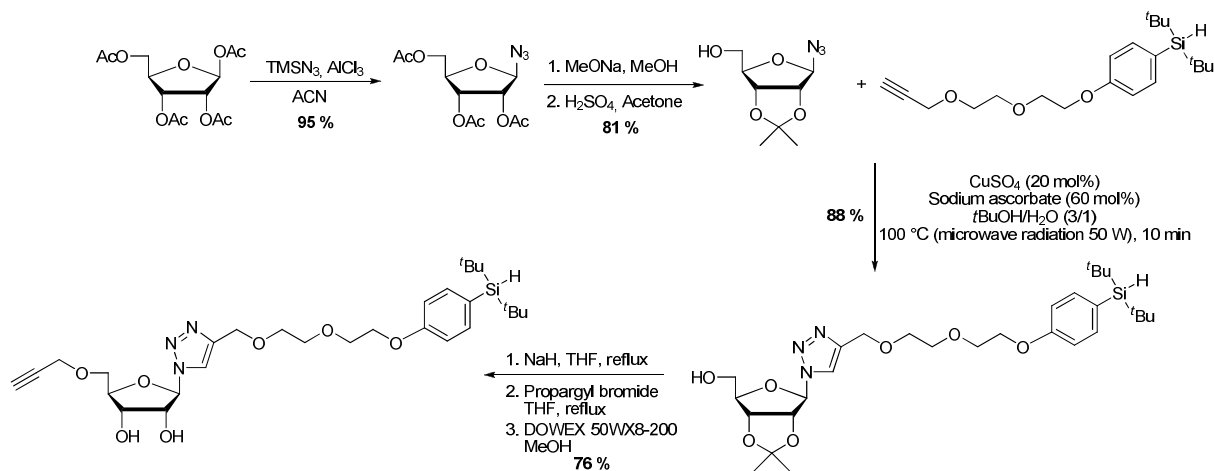


- Préparation du motif ribose-SiH

o Motif SiH

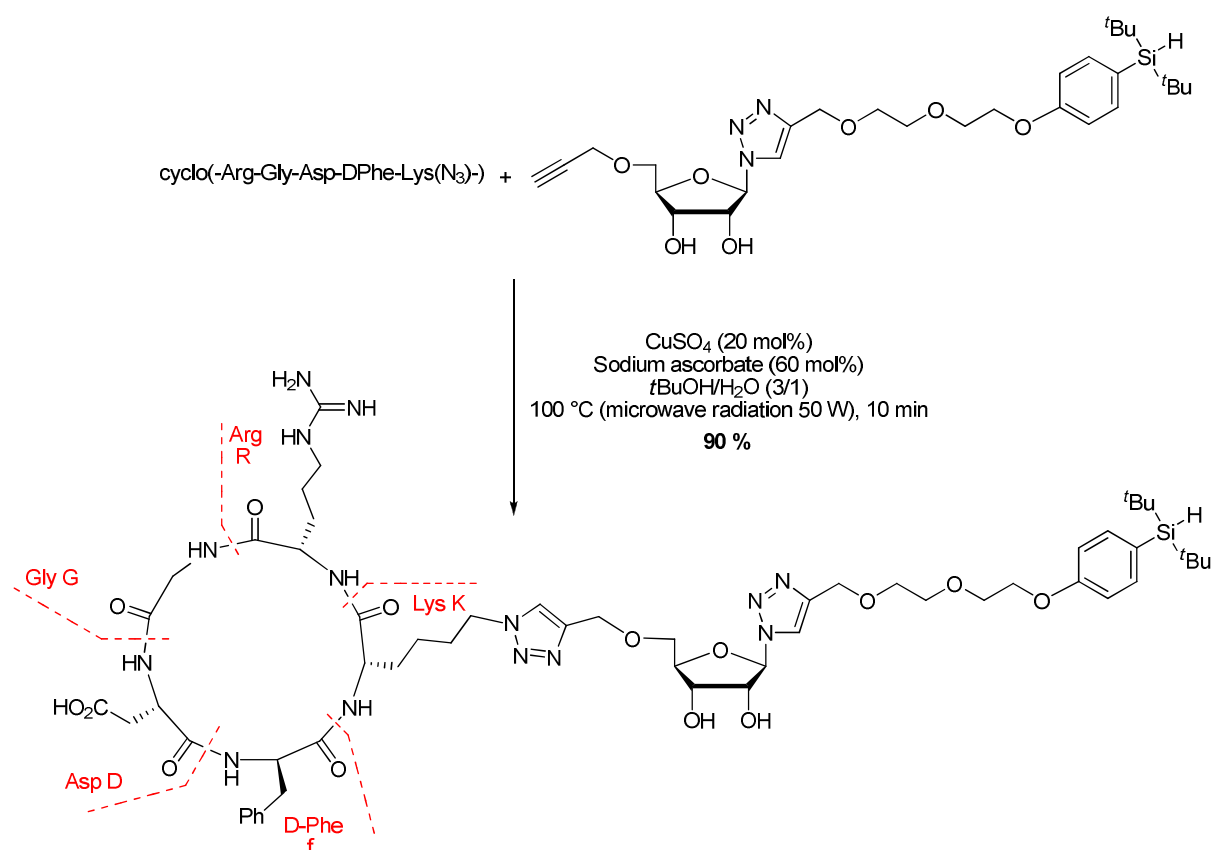


o Motif ribose et couplage avec le motif SiH



Annexe 3 : Schéma de synthèse du précurseur ribofuranose-c(RGDfK) (suite)

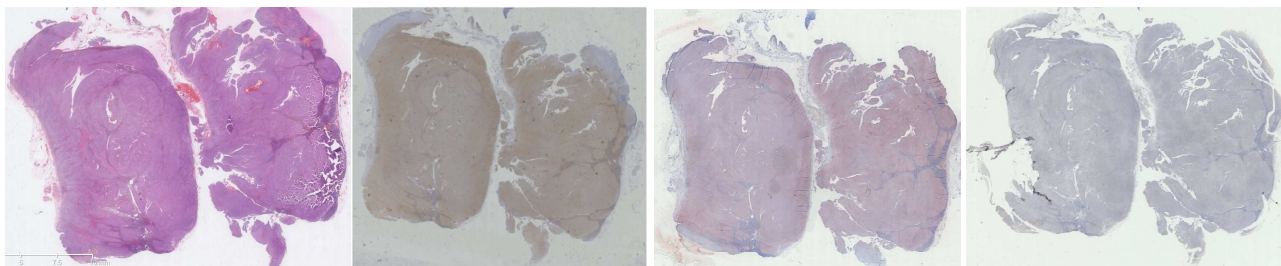
- Couplage des deux motifs c(RGDfK(N₃)) et ribose SiH par chimie « click »



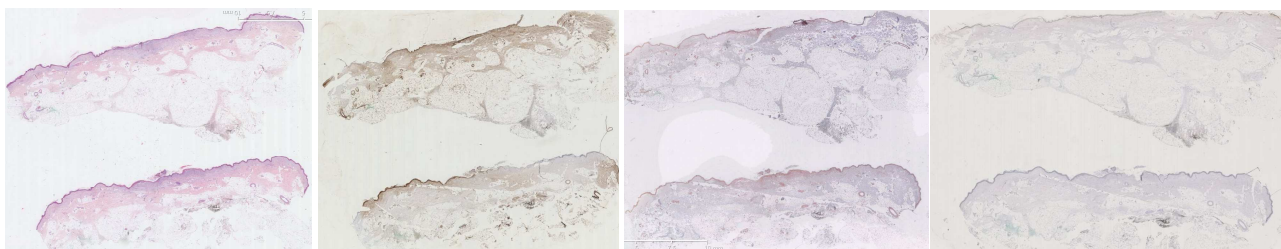
Annexe 4 : Tableau présentant les conditions et résultats de radiomarquage du ¹⁸F-ribofuranose-RGD

Fluoration					HPLC PREP		Rendement		
Vial 4			T °C	Temps	Colonne HPLC	Phase mobile	Cyclo	Classe A	Rdt %
5,0mg RGD	300µL DMSO	3µL Acide acétique	110°C	15min	Luna 250x10	ACN 43/0,1% TFA 57 2,5mL/min	145 951	24 306	16,65
3,8mg RGD	300µL DMSO	3µL Acide acétique	110°C	15min	Luna 250x10	ACN 43/0,1% TFA 57 2,5mL/min	216 928	10 135	4,67
3,7mg RGD	300µL DMSO	3µL Acide acétique	110°C	15min	Luna 250x10	ACN 43/0,1% TFA 57 2,5mL/min	108 906	16 635	15,27
4,6mg RGD	300µL DMSO	3µL Acide acétique	110°C	15min	Luna 250x10	ACN 43/0,1% TFA 57 2,5mL/min	115 941	14 746	12,72
4,8mg RGD	300µL DMSO	3µL Acide acétique	120°C	15min	Luna 250x10	ACN 43/0,1% TFA 57 2,5mL/min	139 324	15 160	10,88
4,1mg RGD	300µL DMSO	3µL Acide acétique	110°C	15min	Luna 250x10	ACN 43/0,1% TFA 57 2,5mL/min	115 941	4 752	4,10
4,1mg RGD	300µL DMSO	3µL Acide acétique	110°C	15min	Luna 250x10	ACN 43/0,1% TFA 57 2,5mL/min	133 727	8 421	6,30

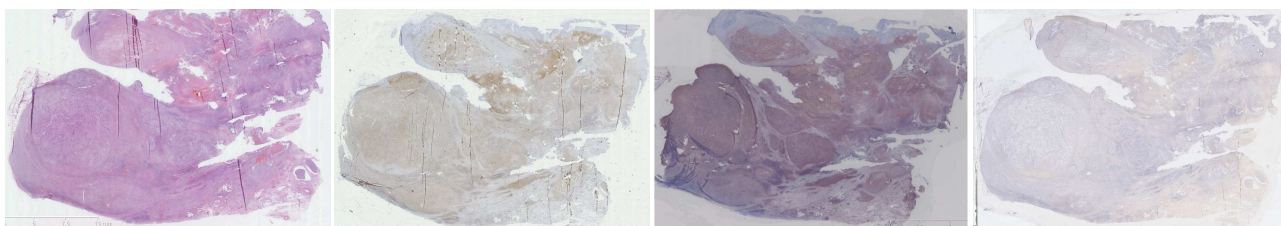
Annexe 5 : Coloration HES et immunohistochimie (IH) comparative de l'expression de la MMP-9 et de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ (Coloration HES, IH $\alpha_v\beta_3$, IH MMP-9, non spécifique)



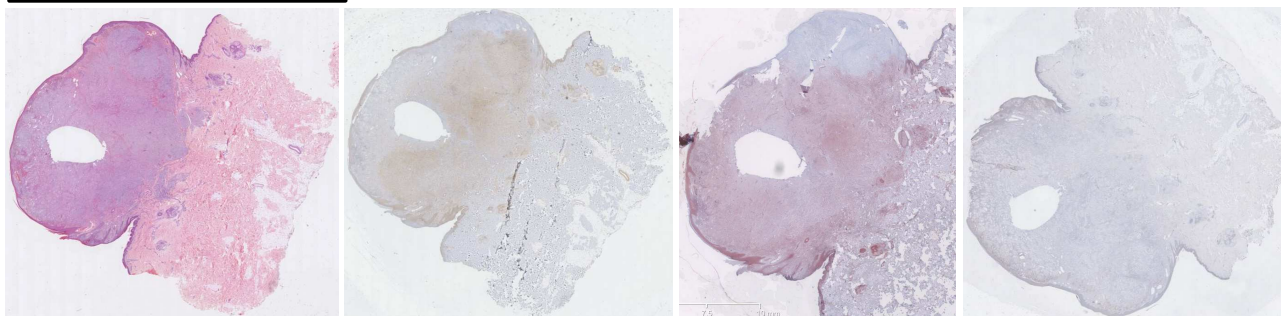
Ganglions métastatiques



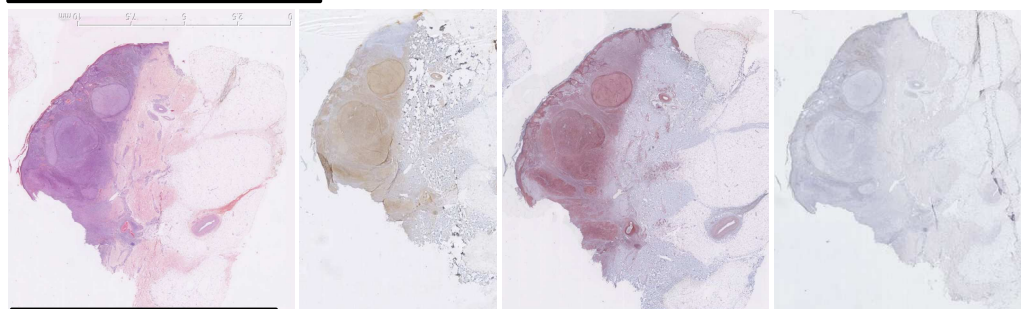
Mélanome de Dubreuilh



Ganglion métastatique

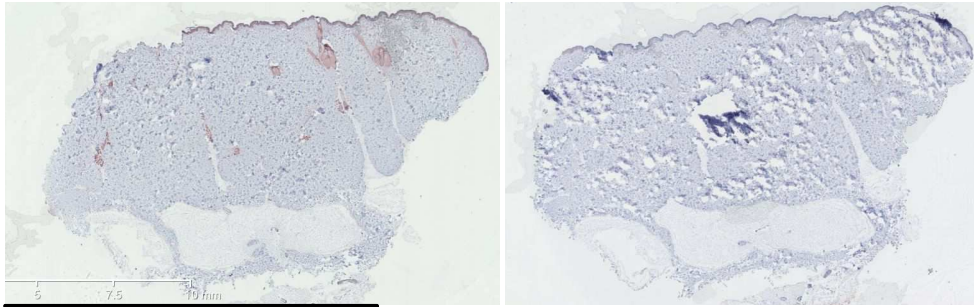


Mélanome nodulaire



Mélanome SSM

Annexe 5 : (suite) Immunohistochimie de l'expression de la MMP-9 (IH anti-MMP-9, non spécifique)



Peau inflammatoire

PRODUCTIONS SCIENTIFIQUES

Communications écrites

Ex Vivo and in Vivo Imaging and Biodistribution of Aptamers Targeting the Human Matrix MetalloProtease-9 in Melanomas

David Kryza, Frédéric Debordeaux, Laurent Azéma, Aref Hassan, Olivier Paurelle, Jurgen Schulz, Catherine Savona-Baron, Elsa Charignon, Pauline Bonazza, Jacqueline Taleb, Philippe Fernandez, Marc Janier and Jean Jacques Toulmé
Plos One soumis

^{99m}Tc-DTPA-bis-c(RGDfK) a potential alpha(v)beta3 integrin based homobivalent radioligand for imaging neoangiogenesis in malignant glioma and melanoma

Frédéric Debordeaux, Jürgen Schulz, Catherine Savona-Baron, Anil Kumar Mishra, Colette Ries, Nicole Barthe, Béatrice Vergier, Philippe Fernandez
RSC Advances, 2015, 5, 60161 - 60171

Communications orales

PIAF: [¹⁸F]-Radiotracers for imaging angiogenesis and evaluate antiangiogenic therapies

P. Fernandez, J. Schulz, S. Brillouet, F. Debordeaux, D. Vimont, M. Szlosek, E. Amigues, A. Mishra, E. Fouquet, F. Courbon, S. Poirot
GSO Journées cancéropôle Grand Sud Ouest, Montpellier 10-12 Octobre 12

Imagerie de la néo-angiogenèse tumorale

F. Debordeaux, J. Schulz, M. Szlosek, E. Amigues, C. Ries, A. Mishra, S. Brillouet, S. Poirot, F. Courbon, E. Fouquet, M. Allard, F. Fernandez
Demi-Journée Imagerie Moléculaire radio-isotopique en Oncologie, Institut de Bio-Imagerie, Bordeaux Laboratoire d'excellence TRAIL, 20 septembre 2011

Mise au point et évaluation d'un ligand fluoré de l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ pour l'imagerie par TEP: intérêt pour l'évaluation des propriétés anti-angiogéniques des thérapies ciblées en onco-dermatologie

Fernandez et ISM CNRS 5255, Bordeaux ICR et INSERM U. 563, F. Courbon, Toulouse
2^{ème} journée groupe mélanome INCA, 2011

Communications affichées

Development of novel tracer for metalloproteinase molecular imaging

F. Debordeaux, J. Schulz, C. Savona-Baron, C. Ries, L. Belanga, L. Azéma, D. Kryza, M. Janier, J.J. Toulmé, P. Fernandez
Symposium of the doctoral school of health and life sciences (DsD), April 16 2015, Arcachon

Development of novel tracer targeting integrin- $\alpha_v\beta_3$ for imaging of tumour neoangiogenesis

F. Debordeaux, J. Schulz, C. Savona-Baron, C. Ries, A. Mishra, M. Allard, P. Fernandez
Symposium of the doctoral school of health and life sciences, April 9 2014, Arcachon

Development of novel tracers targeting integrin- $\alpha_v\beta_3$ for imaging of tumour neoangiogenesis.

F. Debordeaux, J. Schulz, D. Vimont, M. Szlosek, E. Amigues, C. Ries, A. Mishra, S. Brillouet, S. Silvente-Poirot, F. Courbon, E. Fouquet, M. Allard, P. Fernandez
European Symposium on Radiopharmacy and Radiopharmaceuticals, April 26-29 2012, Nantes

Mise au point et évaluation d'un ligand fluoré de l'intégrine alpha v beta 3 pour l'imagerie moléculaire de la néo-angiogenèse tumorale

F. Debordeaux, J. Schulz, M. Szlosek, D. Vimont, E. Amigues, A. Mishra, S. Brillouet, S. Silvente-Poirot, M. Allard, P. Fernandez

50^e Colloque de Médecine Nucléaire, 20-22 avril 2012, Montpellier

Mise au point et évaluation d'un ligand technétié de l'intégrine alpha v beta 3 pour l'imagerie moléculaire de la néo-angiogenèse tumorale

F. Debordeaux, J. Schulz, A. Mishra, C. Ries, C. Lervat, M. Allard, P. Fernandez

50^e Colloque de Médecine Nucléaire, 20-22 avril 2012, Montpellier